



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/87, 15/62, C07K 14/025, 14/075, A61K 47/48, 48/00		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 99/23237 (43) Date de publication internationale: 14 mai 1999 (14.05.99)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/02344 (22) Date de dépôt international: 3 novembre 1998 (03.11.98)		(81) Etats désignés: AU, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(30) Données relatives à la priorité: 97/13771 3 novembre 1997 (03.11.97) FR		Publiée Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.	
(71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): COMMIS-SARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE [FR/FR]; 31-33, rue de la Fédération, F-75015 Paris (FR). CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE-CNRS [FR/FR]; 3, rue Michel Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR).			
(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): CHROBOCZEK, Jadwiga [FR/FR]; 22, cours de la Libération, F-38100 Grenoble (FR). FENDER, Pascal [FR/FR]; Appartement 607, 60, avenue Alsace Lorraine, F-38000 Grenoble (FR).			
(74) Mandataire: CABINET ORES; 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).			

(54) Title: TRANSFECTING PEPTIDE VECTOR, COMPOSITION CONTAINING SAME AND APPLICATIONS

(54) Titre: VECTEUR PEPTIDIQUE DE TRANSFECTION, COMPOSITION LE CONTENANT ET LEURS APPLICATIONS

```

AD11p 1 MT-KRVRLS-----DSFNPVYVYEDESTSQ--HPPFINPQF
AD11a 1 MT-KRVRLS-----DSFNPVYVYEDESTSQ--HPPFINPQF
AD7 1 MT-KRVRLS-----DSFNPVYVYEDESTSQ--HPPFINPQF
AD21 1 MT-KRVRLS-----DSFNPVYVYEDESTSQ--HPPFINPQF
AD3 1 MA-KRAKRLS-----TSFNPVYVYEDESSSQ--HPPFINPQF
AD16 1 MA-KRAKRLS-----SSFNPVYVYEDESSSQ--HPPFINPQF
AD2 1 M-KRAKRLPS-----EDTFNPVYVYDTETGPPT-VPPFLTPPF
AD5 1 M-KRAKRLPS-----EDTFNPVYVYDTETGPPT-VPPFLTPPF
AD4 1 MSK[KRAKARV-----ODGFDPVVYVYDADNA-PT-VPPFINPPF
AD12 1 M-KRSRTOYAAEETEENDDFNPVYVYFDPFDTSD--VPPFVTPPF
AD8 1 MT-KRLRA-----EDDFNPVYVYGYARNQN--IPFLTPPF
AD9 1 MS-KRLRV-----EDDFNPVYVYGYARNQN--IPFLTPPF
AD15 1 MS-KRLRV-----EDDFNPVYVYGYARNQN--IPFLTPPF
AD41-1 1 M-KRAKRL-----EDDFNPVYVYEHYN-PLD-IPF1TPPF
AD40-1 1 M-KRAKRF-----EDDFNPVYVYEHYN-PLD-IPF1TPPF
AD40-2 1 M-KRATRI-----EDDFNPVYVYDTSS-TPS-IPYVAPPF
AD41-2 1 M-KRATRI-----EDDFNPVYVYDTFS-TPS-IPYVAPPF

```

(57) Abstract

The invention concerns transfecting peptide vector, a composition containing said vector and their applications for treating and preventing diseases in human beings and animals. Said vector for transfecting a chemical substance selected in the group consisting of nucleic acid sequences, proteins, peptides and pharmacologically active substances, contains besides said chemical substance, at least a transfecting peptide derived entirely or partially from an adenovirus fibre and comprising at least a zone consisting of at least 50 % hydrophobic amino acids selected in the group consisting of alanine, valine, phenylalanine, isoleucine, leucine, proline and methionine.

(57) Abrégé

Vecteur peptidique de transfection, composition contenant ledit vecteur et leurs applications dans le traitement et la prévention des maladies humaines et animales. Ledit vecteur peptidique de transfection d'une substance chimique sélectionnée dans le groupe constitué par des séquences d'acides nucléiques, des protéines, des peptides et des substances chimiques pharmacologiquement actives, contient outre ladite substance chimique, au moins un peptide de transfection dérivant en tout ou en partie d'une fibre d'adénovirus et comportant au moins une zone constituée d'au moins 50 % d'acides hydrophobes sélectionnés dans le groupe constitué par lalanine, la valine, la phénylalanine, l'isoleucine, la leucine, la proline et la méthionine.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Liberia	SG	Singapour		

7/PRTS

VECTEUR PEPTIDIQUE DE TRANSFECTION, COMPOSITION, LE CONTENANT ET LEURS APPLICATIONS.

La présente invention est relative à un vecteur peptidique de transfection, à une composition contenant ledit vecteur ainsi qu'à leurs applications dans le traitement (médicaments) et la prévention (vaccins) des maladies humaines et animales. Ledit vecteur est notamment apte à dispenser à des cellules cibles convenables, des séquences nucléiques, des protéines, des peptides et des substances chimiques d'intérêt.

Dans le domaine de la thérapie génique, de nombreuses compositions, utiles pour transfacter efficacement les cellules eucaryotes avec un matériel génétique sélectionné ont été décrites.

Il existe essentiellement deux grands types de vecteurs de transfection :

- les vecteurs de transfection naturels, tels que les virus ou les virus modifiés, qui sont efficaces mais qui présentent des limites d'utilisation : non-spécificité tissulaire, nécessité d'obtenir des constructions pour chaque gène d'intérêt et risques potentiels pour l'environnement, qui conduisent à la mise en place d'infrastructures cliniques coûteuses et contraignantes pour le malade et le personnel ;

- des agents non-viraux (vecteurs synthétiques), capables de promouvoir le transfert et l'expression de substances chimiques telles que l'ADN, dans les cellules eucaryotes. Cette dernière stratégie représente une alternative aux vecteurs viraux.

Ces vecteurs synthétiques doivent avoir essentiellement deux fonctions : condenser l'ADN à transfacter et promouvoir sa fixation cellulaire ainsi que son passage à travers la membrane plasmique et éventuellement les membranes nucléaires ; de tels vecteurs doivent donc mimer le fonctionnement des virus, pour être efficaces ; toutefois, il apparaît que les différents vecteurs proposés dans l'art antérieur ne présentent pas ces deux fonctions, de

manière optimale et peuvent, en outre, selon les cas, être toxiques pour les cellules.

Parmi ces agents non-viraux, on peut tout d'abord citer les polymères cationiques et les lipides cationiques. Les premiers sont généralement constitués de polylysine, alors qu'il existe une grande variété de lipides cationiques (liposomes ou pseudo-liposomes), chacun donnant des efficacités de transfection variable suivant les types cellulaires (DOTMA, etc...).

La partie lipidique qui interagit avec et/ou déstabilise les membranes permet la fusion et l'entrée du complexe ADN/liposome.

Cependant, la transfection d'ADN par les liposomes, bien que moins immunogénique que celle réalisée à l'aide des polymères cationiques, est en fait un procédé relativement inefficace.

Le mécanisme majeur de l'entrée des complexes ADN/liposomes, est, semble-t-il, l'endocytose ; en conséquence, l'ADN transfecté est piégé dans les vésicules intracellulaires et détruit par les enzymes lysosomales.

Même si une partie de l'ADN transfecté est libéré dans le cytoplasme par un effet d'action de masse, seulement une petite fraction de cet ADN se retrouve effectivement dans le noyau.

Des agents capables d'augmenter la libération de l'ADN des vésicules endosomiques et son passage dans le noyau peuvent augmenter le taux de transfert génique.

Parmi ces agents, on distingue :

- ceux qui ciblent le complexe vers un autre point d'entrée : le ciblage est obtenu par exemple en couplant des ligands aux polymères de polylysine ; le ciblage peut aussi se faire après l'internalisation, en dirigeant les complexes vers le noyau (Demande Internationale PCT WO 95/31557) et
- ceux qui évitent la dégradation endosomale : pour échapper à la dégradation endosomale, il a été proposé d'incorporer un agent endosomolytique dans le complexe, tel que des particules adénovirales (Demande

Internationale PCT WO 93/07283) ou plus récemment des peptides synthétiques à activité endosomolytique, qui augmentent la libération de l'ADN dans le cytoplasme.

Compte tenu de ce qui précède, différents types de complexes 5 ont été proposés ; on peut citer, des complexes associant des liposomes et des peptides, tels que ceux décrits dans :

- la Demande Internationale WO 96/25508, qui décrit des compositions comprenant (i) l'acide nucléique à transfacter, (ii) un agent de transfection, tel qu'un polymère cationique et/ou un lipofectant, (iii) un 10 composé peptidique intervenant au niveau de la condensation de l'acide nucléique, constitué en tout ou partie de motifs peptidiques possédant une majorité d'acides aminés à caractère basique comme la lysine, l'histidine, l'arginine (histones, nucléoline, protamine ou leurs dérivés) et éventuellement 15 (iv) un élément de ciblage permettant d'orienter le transfert de l'acide nucléique, tel qu'un ligand de type intracellulaire comme une séquence signal de localisation nucléaire (NLS) qui privilégie l'accumulation de l'ADN transfected au sein du noyau et qui peut être associé au composé peptidique pour former un peptide chimère comprenant un fragment de protéine (histone ou protamine ou nucléoline) et une séquence NLS. Toutefois, ce système nécessite 20 la présence d'un polymère cationique et/ou d'un lipofectant, qui ont l'inconvénient d'être toxiques et/ou coûteux.

- la Demande Internationale WO 97/30170 qui décrit également des compositions pour la transfection des cellules eucaryotes, qui comprennent l'acide nucléique à transfacter, au moins un lipide cationique à 25 une concentration suboptimale et au moins un peptide acide (actif sur la membrane), qui déstabilise la membrane endosomique et augmente ainsi l'efficacité de la transfection. Le rapport charge positives/charges négatives est compris entre 0 et 3. Les peptides sélectionnés sont issus du virus de l'influenza, pour induire une rupture effective des endosomes. La présence des

lipides est nécessaire, dans cette composition, du fait que le peptide sélectionné ne permet pas le passage de la première membrane cellulaire.

De tels complexes ne permettent donc pas d'éviter les inconvénients liés à l'utilisation de liposomes.

5 C'est sans doute la raison pour laquelle des complexes ne mettant en oeuvre que des peptides ont été proposés :

10 - la Demande de Brevet européen 0 544 292, qui décrit un complexe de transfection d'acide nucléique qui comprend une protéine de fusion constituée d'un facteur cellulaire (facteur de croissance, antigène viral, 15 toxine, intégrine ou lipoprotéine) et d'un peptide polycationique basique comprenant des résidus arginine et/ou lysine.

15 - la Demande Internationale WO 94/23751, qui décrit un peptide de transfert qui comprend trois parties : (1) un ligand L1 (peptide de 2 à 100 aminoacides, apte à se lier à un site de liaison à la surface des cellules eucaryotes (récepteur membranaire) (exemple : peptide RGD, domaine de liaison des facteurs de croissance, des hormones, des antigènes viraux ou des lipoprotéines ; (2) un ligand L2 similaire à L1 (peptide de 2 à 20 aminoacides), qui se lie à la membrane nucléaire externe des cellules eucaryotes, telle qu'une séquence NLS et (3) un ligand L3 correspondant à un peptide basique (3 à 100 20 aminoacides) (fragment d'histone H1 ou H2B, par exemple). Les peptides de transfert décrits dans cette Demande ont donc une structure générale ligand d'un récepteur membranaire-ligand de la membrane nucléaire externe-peptide basique. Une telle structure a été proposée afin d'améliorer la spécificité du complexe vis-à-vis de cellules cibles, mais présente une toxicité du 25 même ordre que celle des liposomes ; en outre, il faut adapter la construction en fonction des cellules cibles (présence de récepteurs spécifiques sur les cellules cibles) et

30 - la Demande internationale WO 95/31557 qui décrit un vecteur de transfection comprenant un peptide synthétique et l'acide nucléique à transfacter. Le peptide synthétique comprend une chaîne polymé-

rique d'acides aminés basiques, de préférence en position C-terminale (10-50 aminoacides, tels que lysine, arginine et ornithine), un peptide NLS (6-15 aminoacides, tels que la séquence NLS de l'antigène T de SV40, la séquence NLS de l'antigène T de polyome, la séquence NLS d'adénovirus E1a ou la 5 séquence NLS d'adénovirus E1b, de préférence en position N-terminale et une région charnière d'acides aminés neutres (6-50 aminoacides sélectionnés parmi la glycine, l'alanine, la leucine et l'isoleucine), entre la chaîne polymérique et le peptide NLS. La séquence NLS préférée est la séquence de l'antigène T du virus SV40 (petite séquence d'acides aminés basiques : PKKKRKV), qui est efficace dans les cellules de mammifère ou une séquence hydrophobe courte qui 10 contient un ou plusieurs acides aminés basiques (KIPIK). La séquence charnière, comprend 6-26 aminoacides neutres sélectionnés uniquement parmi Gly (G), Ala (A), Leu (L) et Ile (I). Le rapport (en poids) peptide:ADN est compris entre 1:1 et 1:10. Le peptide décrit dans ce document passe difficilement la 15 membrane cellulaire et c'est la raison pour laquelle, il est préconisé, dans cette Demande internationale de traiter les cellules avant la transfection : les cellules sont traitées avec une solution hypertonique, puis avec une solution hypotonique en présence du complexe acide nucléique-peptide. La solution hypertonique peut contenir du PEG (0,3 M-0,6 M) et du saccharose (10-25 %).

20 Ces différents complexes possèdent la propriété de condenser l'ADN et de promouvoir son association avec la membrane cellulaire ; toutefois ils sont loin d'être aussi performants que les vecteurs viraux, notamment en raison d'une condensation insuffisante de l'ADN à transfacter et/ou des difficultés rencontrées par l'ADN transfected pour sortir de l'endosome sans 25 être dégradé et pour pénétrer dans le noyau cellulaire.

Cherchant à mettre au point de nouveaux vecteurs ne présentant pas les inconvénients des vecteurs viraux, les Inventeurs ont mis au point le vecteur décrit dans la Demande Internationale WO 97/18317, qui décrit des compositions comprenant un complexe protéique adénoviral constitué :

A. d'un complexe protéique adénoviral, à savoir :

- soit de 12 pentons, comprenant chacun au moins une fibre et une base de penton, à l'exclusion de tout autre élément constitutif du génome d'un adénovirus, lesquelles fibre(s) et base du penton sont dérivées soit du même adénovirus, soit d'adénovirus différents, lesdits pentons étant liés par les bases de penton et formant une structure en dodécaèdre, stable aux enzymes protéolytiques, lequel complexe présente un poids moléculaire compris entre $4,8.10^6$ et $6,6.10^6$;
- soit de 12 bases de pentons, à l'exclusion de tout autre élément constitutif du génome d'un adénovirus, lesquelles bases de penton sont dérivées soit du même adénovirus, soit d'adénovirus différents, et forment une structure en dodécaèdre, stable aux enzymes protéolytiques et en ce qu'il présente un poids moléculaire compris entre $3,2.10^6$ et 4.10^6 .

B. d'une séquence d'acide nucléique à transfacter et

- C. d'un ligand entre le complexe protéique adénoviral et l'acide nucléique, tel que les peptides dont la partie N-terminale comprend la séquence en aminoacides N-terminales d'une fibre d'adénovirus de n'importe quel sérotype (zone d'attachement au complexe protéique adénoviral) et dont la partie C-terminale comprend une polylysine ou une polyarginine.

Les vecteurs de transfection décrits dans cette Demande permettent l'internalisation de la séquence nucléique à transfacter et augmentent la perméabilité des endosomes ; il s'agit toutefois d'une structure relativement complexe qui mime le comportement des adénovirus ; en effet, les particules d'adénovirus sont relativement complexes et comprennent plusieurs sous-structures ; en particulier la partie externe ou capside est formée majoritairement de trois protéines : l'hexon, la base du penton et la fibre ; la fibre permet l'attachement du virion à un récepteur cellulaire, alors que la base du penton permet l'internalisation du virion.

Poursuivant leurs recherches, les Inventeurs ont trouvé que de manière inattendue, un peptide dérivé de la protéine de fibre d'adénovirus

est capable de transfecter, de manière efficace, des séquences d'acides nucléiques ou des protéines, en l'absence de liposomes et de traitement des cellules.

La présente invention a pour objet un vecteur peptidique de transfection d'une substance chimique sélectionnée dans le groupe constitué par des séquences d'acides nucléiques, des protéines, des peptides et des substances chimiques pharmacologiquement actives, caractérisé en ce qu'il contient outre ladite substance chimique, au moins un peptide de transfection dérivant en tout ou en partie d'une fibre d'adénovirus et comportant au moins une zone constituée d'au moins 50 % d'aminoacides hydrophobes sélectionnés dans le groupe constitué par lalanine, la valine, la phénylalanine, l'isoleucine, la leucine, la proline et la méthionine.

Conformément à l'invention, ledit peptide dérive d'une fibre d'un adénovirus sélectionné dans le groupe constitué par Ad2, Ad3, Ad4, Ad7, Ad8, Ad9, Ad11, Ad12, Ad15, Ad16, Ad21, Ad40, Ad41, FAV1 (CELO) et FAV7 ou d'un fragment de la protéine Vp3 du virus SV40.

Selon un mode de réalisation avantageux dudit vecteur de transfection, ledit peptide de transfection comprend au moins :

- un segment d'une séquence NLS dérivée d'une fibre d'adénovirus comprenant entre 4 et 5 aminoacides et incluant une séquence sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences suivantes : X₀-Lys-Arg-Val-Arg (X₀KRVR) (SEQ ID NO:1), X₀-Lys-Arg-Ala-Arg (X₀KRAR) (SEQ ID NO:2), X₀-Lys-Arg-Ser-Arg (X₀KRSR) (SEQ ID NO:3), X₀-Lys-Arg-Leu-Arg (X₀-KRLR) (SEQ ID NO:4), X₀-Lys-Arg-Thr-Arg (X₀KRTR) (SEQ ID NO:5), X₀-Pro-Lys-Lys-Pro-Arg (X₀PKKPR) (SEQ ID NO:6), dans lesquelles X₀ est nul ou représente Thr (T), Ala (A), Ser-Lys (SK) ou Ser (S), ou un segment de la protéine Vp3 du virus SV40 et notamment la séquence GPNKKKRKL (SEQ ID NO:24),

- une séquence hydrophobe comprenant entre 7 et 50 aminoacides, dérivée d'une fibre d'adénovirus et sélectionnée dans le groupe consti-

tué par au moins l'une des séquences suivantes X_1 -Phe-Asn-Pro-Val-Tyr-Pro-Tyr- X_2 (X_1 FNPVYPY X_2) (SEQ ID NO:7), X_1 -Phe-Asp-Pro-Val-Tyr-Pro-Tyr- X_2 (X_1 FDPVYPY X_2) (SEQ ID NO:8), dans lesquelles :

5 X_1 est nul ou représente une séquence d'au plus 43 aminoacides, de préférence une séquence de 5 à 15 aminoacides, comprenant des aminoacides hydrophobes et/ou polaires et/ou chargés acides, et notamment l'une des séquences suivantes : Leu-Ser-Asp-Ser (LSDS) (SEQ ID NO:9), Leu-Ser-Thr-Ser (LSTS) (SEQ ID NO:10), Leu-Ser-Ser-Ser (LSSS) (SEQ ID NO:11), Pro-Ser-Glu-Asp-Thr (PSEDT) (SEQ ID NO:12), Val-Asp-Asp-Gly (VDDG) (SEQ ID NO:13), Thr-Gln-Tyr-Ala-Glu-Glu-Thr-Glu-Glu-Asn-Asp-Asp (TQYAEETEENDD) (SEQ ID NO:14) ou X_3 -Glu-Asp-Asp (X_3 EDD) (SEQ ID NO:15) dans laquelle X_3 représente Ala (A), Val (V), Leu (L), Phe (F) ou Ile (I) et

10

15 X_2 est nul ou représente une séquence d'au plus 43 aminoacides, de préférence une séquence de 5 à 15 aminoacides, comprenant des aminoacides hydrophobes et/ou polaires et/ou chargés, et notamment l'une des séquences suivantes : Glu-Asp-Glu-Ser (EDES) (SEQ ID NO:16), Asp-Thr-Glu-Thr (DTET) (SEQ ID NO:17), Asp-Ala-Asp-Asn (DADN) (SEQ ID NO:18), Asp-Pro-Phe-Asp (DPFD) (SEQ ID NO:19), Gly-Tyr-Ala-Arg (GYAR) (SEQ ID NO:20), Glu-His-Tyr-Asn (EHYN) (SEQ ID NO:21), Asp-Thr-Ser-Ser (DTSS) (SEQ ID NO:22) ou Asp-Thr-Phe-Ser (DTFS) (SEQ ID NO:23) et

20

- une séquence polymérique d'aminoacides basiques ou une séquence polymérique cationique ou un polyalcool.

On entend par :

25 - aminoacides hydrophobes, les aminoacides suivants : Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe et Met ;

- aminoacides chargés acides, les aminoacides suivants : Asp et Glu ;

- aminoacides chargés basiques, les aminoacides suivants : Lys, Arg et ornithine ; et

30

- aminoacides polaires neutres, les aminoacides suivants : Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln, His et Trp.

De manière avantageuse, ledit peptide de transfection est branché et comprend au moins deux fragments dérivant d'une fibre d'adénovirus ; lesdits fragments comportent chacun un segment d'une séquence NLS et une séquence hydrophobe, tels que définis ci-dessus et sont reliés entre eux par une séquence polymérique telle qu'une séquence polymérique d'aminoacides basiques.

Lorsque la substance chimique est une séquence d'acide nucléique, elle est sélectionnée parmi les gènes qui codent pour un polypeptide présentant une activité thérapeutique, les séquences anti-sens et les ribozymes.

Dans le cas d'une séquence codante, elle comprend en outre un promoteur actif pour l'expression du polypeptide.

Ledit promoteur est notamment sélectionné dans le groupe constitué par des promoteurs constitutifs et des promoteurs inductibles.

De manière surprenante, un tel vecteur peptidique de transfection ne comprenant pas de lipides (sous forme de liposomes, par exemple), ni de base du penton est apte à transfecter, de manière efficace, notamment des séquences d'acide nucléique de n'importe quelle taille, jusqu'au noyau et ce sans empoisonner la cellule transfectée.

Dans tous les cas, la séquence d'acide nucléique exogène, la protéine d'intérêt ou toute autre substance chimique, associée au dit vecteur de transfection pénètre dans la cellule (internalisation).

De manière surprenante, l'interaction peptide de transfection-récepteur cellulaire accroît, de manière significative, à la fois l'internalisation du vecteur de transfection et la perméabilité des endosomes, ce qui augmente, de manière significative, le passage de l'acide nucléique exogène, de la protéine d'intérêt ou de toute autre substance chimique des endosomes vers le

cytoplasme et vers le noyau, en comparaison avec l'utilisation d'un vecteur incluant des lipides (sous la forme de liposomes, par exemple).

De tels vecteurs peptidiques de transfection se révèlent, de manière surprenante, plus efficaces et moins toxiques que des compositions 5 contenant des liposomes (lipides cationiques ou lipofectants).

Selon un autre mode de réalisation avantageux dudit vecteur de transfection, ledit peptide de transfection comprend au moins :

- un segment d'une séquence NLS dérivée d'une fibre d'adénovirus comprenant entre 4 et 5 aminoacides et incluant une séquence 10 sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences suivantes : X_0 -Lys-Arg-Val-Arg (X_0 KRVR) (SEQ ID NO:1), X_0 -Lys-Arg-Ala-Arg (X_0 KRAR) (SEQ ID NO:2), X_0 -Lys-Arg-Ser-Arg (X_0 KRSR) (SEQ ID NO:3), X_0 -Lys-Arg-Leu-Arg (X_0 -KRLR) (SEQ ID NO:4), X_0 -Lys-Arg-Thr-Arg (X_0 KRTR) (SEQ ID NO:5), X_0 -Pro-Lys-Lys-Pro-Arg (X_0 PKKPR) (SEQ ID NO:6), dans lesquelles X_0 est nul ou 15 représente Thr (T), Ala (A), Ser-Lys (SK) ou Ser (S), ou un segment de la protéine Vp3 du virus SV40 et notamment la séquence GPNKKKRKL (SEQ ID NO:24),

- une séquence hydrophobe comprenant entre 7 et 50 aminoacides, dérivée d'une fibre d'adénovirus et sélectionnée dans le groupe constitué par au moins l'une des séquences suivantes X_1 -Phe-Asn-Pro-Val-Tyr-Pro-20 Tyr- X_2 (X_1 FNPVYPY X_2) (SEQ ID NO:7), X_1 -Phe-Asp-Pro-Val-Tyr-Pro-Tyr- X_2 (X_1 FDPVYPY X_2) (SEQ ID NO:8), dans lesquelles :

X_1 est nul ou représente une séquence d'au plus 43 aminoacides, de préférence une séquence de 5 à 15 aminoacides, comprenant des 25 aminoacides hydrophobes et/ou polaires et/ou chargés acides, et notamment l'une des séquences suivantes : Leu-Ser-Asp-Ser (LSDS) (SEQ ID NO:9), Leu-Ser-Thr-Ser (LSTS) (SEQ ID NO:10), Leu-Ser-Ser-Ser (LSSS) (SEQ ID NO:11), Pro-Ser-Glu-Asp-Thr (PSEDT) (SEQ ID NO:12), Val-Asp-Asp-Gly (VDDG) (SEQ ID NO:13), Thr-Gln-Tyr-Ala-Glu-Glu-Thr-Glu-Glu-Asn-Asp-Asp 30 (TQYAAEETEENDD) (SEQ ID NO:14) ou X_3 -Glu-Asp-Asp (X_3 EDD) (SEQ ID

NO:15) dans laquelle X_3 représente Ala (A), Val (V), Leu (L), Phe (F) ou Ile (I) et

X_2 est nul ou représente une séquence d'au plus 43 aminoacides, de préférence une séquence de 5 à 15 aminoacides, comprenant des 5 aminoacides hydrophobes et/ou polaires et/ou chargés, et notamment l'une des séquences suivantes : Glu-Asp-Glu-Ser (EDES) (SEQ ID NO:16), Asp-Thr-Glu-Thr (DTET) (SEQ ID NO:17), Asp-Ala-Asp-Asn (DADN) (SEQ ID NO:18), Asp-Pro-Phe-Asp (DPFD) (SEQ ID NO:19), Gly-Tyr-Ala-Arg (GYAR) (SEQ ID NO:20), Glu-His-Tyr-Asn (EHYN) (SEQ ID NO:21), Asp-Thr-Ser-Ser (DTSS) 10 (SEQ ID NO:22) ou Asp-Thr-Phe-Ser (DTFS) (SEQ ID NO:23), lequel peptide de transfection est associé à une séquence polymérique d'aminoacides basiques, un polymère cationique ou à un polyalcool.

Selon un autre mode de réalisation avantageux dudit vecteur peptidique de transfection, la séquence polymérique d'aminoacides basiques 15 comprend entre 10 et 50 résidus d'aminoacides, sélectionnés dans le groupe constitué par la lysine, l'arginine et l'ornithine.

Selon un autre mode de réalisation avantageux dudit vecteur peptidique de transfection, la séquence polymérique cationique est sélectionnée dans le groupe constitué par les polyamines et les polymères 20 d'ammonium quaternaire ; une polyamine préférée est la polyéthylèneimine (PEI).

Conformément à l'invention, ledit polyalcool est de préférence en C_3 - C_{20} , et notamment du glycérol ou des dextrans.

Selon un autre mode de réalisation avantageux dudit vecteur peptidique de transfection, la séquence NLS est à l'extrémité N-terminale du peptide de transfection et la séquence polymérique d'aminoacides basiques est à l'extrémité C-terminale dudit peptide de transfection.

Selon un autre mode de réalisation avantageux dudit vecteur peptidique de transfection, lorsque la substance chimique est un acide 30 nucléique, le rapport peptide de transfection/acide nucléique est compris

entre 0,3:1 et 15:1, de manière préférée entre 2:1 et 6:1, de préférence entre 4:1 et 6:1.

Selon un autre mode de réalisation avantageux dudit vecteur peptidique de transfection, il est associé à un ligand de ciblage.

5 L'invention a également pour objet une composition, caractérisée en ce qu'elle est essentiellement constituée par un vecteur de transfert tel que défini ci-dessus et un véhicule convenable sélectionné dans le groupe constitué par les sels biliaires, les antiprotéases, les cyclodextrines et leurs dérivés, les antiseptiques et les polyols.

10 Les compositions selon l'invention ont de nombreuses applications comme médicaments, en médecine humaine et vétérinaire :

- en thérapie génique humaine et animale, notamment dans les maladies héréditaires,

15 - comme agents antiviraux (séquences anti-sens ou ribozymes),
- comme agents immunogènes ou vaccinaux,
- comme agents antibactériens, anticancéreux etc...

La présente invention a également pour objet un procédé de transfection *in vitro* de cellules eucaryotes avec une substance chimique sélectionnée dans le groupe constitué par des séquences d'acides nucléiques, des 20 protéines, des peptides et des substances chimiques pharmacologiquement actives, caractérisé en ce qu'il comprend la mise en contact et l'incubation d'un vecteur peptidique de transfection conforme à l'invention, dans un tampon de dilution comprenant du NaCl 100-150 mM avec des cellules eucaryotes pendant 15 à 120 minutes à température ambiante, le rapport substance 25 chimique à transfecter : peptide de transfection étant compris entre 0,3:1 et 15:1, de manière préférée entre 2:1 et 6:1, de préférence entre 4:1 et 6:1.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre,

qui se réfère à des exemples de mise en oeuvre du procédé objet de la présente invention ainsi qu'aux dessins annexés, dans lesquels :

- la figure 1 illustre le transfert du gène de la luciférase avec le peptide I, en fonction du temps (figure 1A) ou en fonction de la concentration en NaCl (figure 1B).

- la figure 2 illustre la cinétique de l'expression du gène de luciférase ; cette figure comporte en abscisse les rapports peptide de transfection/ ADN ou DOTAP/ ADN et en ordonnées, le pourcentage de transfection à J1 (□), J2 (▨), J3 (▨) et J6 (▨) ;

- la figure 3 représente les migrations obtenues sur un gel de retardement, en fonction de la quantité de peptide de transfection ;

- la figure 4 illustre les transfections obtenues avec les liposomes DOSPER et DOTAP ; cette figure comporte en abscisse les rapports liposomes/ ADN et en ordonnées les RLU (*Related Light Unit*)/10sec/10⁵ cellules ;

- la figure 5 illustre la cinétique d'entrée dans les cellules d'un peptide (peptide I), observée en microscopie confocale ; la colonne A montre le peptide fluorescent et la colonne B montre les acides nucléiques cellulaires colorés au iodure de propidium ;

- la figure 6 illustre l'inhibition de la transfection par le peptide I, après une préincubation avec un excès de peptide I. Les cellules HeLa dans des plaques comportant 24 trous sont préincubées avec le peptide I pendant une heure à 4°C à des concentrations de 10 à 50 µg/ml, respectivement ;

- la figure 7 représente quelques séquences de fibres d'adénovirus.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

EXEMPLE 1 : Matériel et méthodes.- Cellules, plasmide et peptides :

Les cellules HeLa sont cultivées à 37°C dans un milieu EMEM supplémenté en sérum de veau foetal à 10 % sous une atmosphère contenant 5 % de CO₂.

Un vecteur reporter de la luciférase (plasmide pGL3, Promega), est utilisé pour démontrer la transfection.

Le peptide IC comprend la séquence n° 2, la séquence n° 10, la séquence n° 7, la séquence n° 16, de l'extrémité N-terminale à l'extrémité C-terminale et 10 lysines ; ce peptide correspond aux 20 résidus N-terminaux de la fibre d'Ad3. Le peptide I contient ces mêmes 20 aminoacides N-terminaux de la fibre d'Ad3 et 20 lysines ; les peptides ont été obtenus par synthèse en phase solide, suivie d'une purification par HPLC.

Ce peptide I est marqué à la fluorescéine ; des peptides comprenant 10 lysines au lieu de 20, ont été également préparés. L'intégrité de l'ensemble des peptides est vérifiée par spectroscopie de masse.

- Gel de retardement :

500 ng d'ADN plasmidique (pGL3) sont préincubés avec différentes quantités de peptides pendant 5 min à température ambiante, puis 20 soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose à 1 % préparé dans un tampon TBE.

Après électrophorèse à 50 V dans le tampon TBE pendant 30 min, l'ADN sur le gel étant coloré au bromure d'éthidium et visualisé en lumière ultraviolette.

25 - Transfections :

1,5 à 12 µg de peptide I dans 50 µl de tampon de dilution (Tris 20 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM) sont incubés avec 1,5 µg de plasmide pGL3 dans 250 µl de milieu EMEM pendant 15 à 30 min à température ambiante.

Le mélange de DOTAP ou de DOSPER avec 1,5 µg de 30 plasmide pGL3 est préparé selon les instructions du fabricant (Boehringer).

Pour les études de l'effet du peptide sur la transfection en présence des liposomes, des portions de peptides sont mélangées avec le DOTAP ou le DOSPER dans le tampon de dilution défini plus haut pendant 15 à 30 min à température ambiante, puis 1,5 µg de plasmide pGL3 est ajouté et incubé 15 min à température ambiante.

Les transfections sont réalisées dans des plaques comportant 24 puits (Beckton Dickinson) avec $1,5 \times 10^5$ cellules/puits (confluence d'environ 50 %) pendant 1 h à 37°C. Après 24 h, l'émission lumineuse est mesurée dans les lysats cellulaires avec le test Promega Luciferase Assay System.

- Test hémolytique :
Des érythrocytes humains sont lavés 3 fois avec du tampon PBS. 10^6 érythrocytes sont incubés avec 6 µg de peptide I pendant différentes périodes de temps à 37°C. Après centrifugation à 10 000 g pendant 5 min, la densité optique du surnageant est mesurée à 540 nm.

- Internalisation du peptide :
Des cellules HeLa, cultivées sur lamelles (10^5 cellules/lamelle) sont traitées avec de la sérum albumine bovine à 3 % dans du EMEM pendant 15 min à 37°C.

Les cellules sont lavées deux fois avec du tampon PBS, incubées avec 40 µg/ml de peptide I marqué à la fluorescéine pendant différentes durées à 37°C, fixées avec du paraformaldéhyde à 2 % dans du PBS pendant 20 min à 37°C, lavées avec du PBS et colorées avec 1 µg/ml d'iodure de propidium dans du PBS pendant 5 min à température ambiante.

Les lamelles sont montées sur une lame de microscope avec du 1,4-diazabicyclooctane (Sigma) et observées sur un microscope confocal MRC600 (BioRad).

* Résultats :

- Transfection cellulaire avec le peptide I :

Toutes les expériences ont été réalisées avec des cellules HeLa transfectées par le plasmide pGL3 (Stratagene) portant le gène de la luciférase.

5 Pour des rapports peptide I/ADN égaux à 2, le temps optimal d'interaction entre les complexes transfectants et les cellules est compris entre 60 et 120 min (figure 1A).

L'effet des concentrations de NaCl a été testé pendant 1 h de transfection sur l'expression génique mesurée 24 h après la transfection

10 (figure 1B).

Il existe un optimum de transfection pour des rapports peptide I/ADN compris entre 4 et 6 et pour une concentration en NaCl de 125 mM. Les concentrations inférieures à 100 mM et supérieures à 150 mM semblent inhibitrices.

15 L'expression du transgène peut être observée jusqu'à 6 jours après la transfection (figure 2). Cependant, l'addition de sérum à 2 % abolit complètement la transfection avec le peptide I.

Le comportement des complexes ADN/peptide est analysé sur des gels à retardement. Théoriquement, 526 molécules de peptide sont

20 nécessaires pour neutraliser les charges de phosphate portées par le plasmide (5256 pb), ce qui signifie que 322 ng de peptide I sont nécessaires pour la neutralisation complète de 500 ng de plasmide.

La figure 3 montre que l'incubation avec 250 ng de peptide entraîne un retardement de la migration de l'ADN et l'addition de 500 ng de peptide stoppe complètement sa migration, ce qui est en accord avec les considérations théoriques exposées ci-dessus.

25 L'efficacité de transfection la plus importante est observée lorsque l'on a un excès de l'ordre de 4, de charges neutralisantes peptidiques par rapport à l'ADN (figure 1B), ce qui confirme que le transfert du gène 30 n'intervient qu'en présence d'un excès de charges positives.

- Paramètres intervenant sur l'efficacité de la transfection par le peptide selon l'invention :

Les peptides selon l'invention comprennent essentiellement 3 domaines, le signal de localisation nucléaire, le domaine hydrophobe et le polymère basique.

Pour étudier l'effet de la structure du peptide sur la transfection d'ADN, une série de peptides dans lesquels les différentes parties du peptide I ont été éliminées, dont les séquences sont illustrées au Tableau I ci-après :

10

TABLEAU I

Peptide	Séquences*
I	A K R A R L S T S F N P V Y P Y E D E S - K ₂₀ = SEQ ID NO:2 + SEQ ID NO:10 + SEQ ID NO:7 + SEQ ID NO:16-K ₂₀
IC	A K R A R L S T S F N P V Y P Y E D E S - K ₁₀ = SEQ ID NO:2 + SEQ ID NO:10 + SEQ ID NO:7 + SEQ ID NO:16-K ₁₀
IE	A K R A R L S T S E D E S - K ₁₀ = SEQ ID NO:10 + SEQ ID NO:7 + SEQ ID NO:16-K ₁₀
ID	A K R A R L S T S F N P V Y P Y E D E S - K ₂₀ = SEQ ID NO:10 + SEQ ID NO:7 + SEQ ID NO:16-K ₂₀
IA	A K R A R L S T S F N P V Y P Y E D E S = SEQ ID NO:2 + SEQ ID NO:10 + SEQ ID NO:7 + SEQ ID NO:16
LII	A K R A R L S T S F N P V Y P Y E D E S - K A K R A R L S T S F N P V Y P Y E D E S - K (pour chaque branche : SEQ ID NO:2 + SEQ ID NO:10 + SEQ ID NO:7 + SEQ ID NO:16)

* dans lesquelles X₀ = A.

Les résultats obtenus avec ces différents peptides sont illustrés au Tableau II ci-après.

TABLEAU II

Peptide (μg)	ADN (μg)	RLU/10 s/10 ⁵ cellules × 10 ³
<u>Peptide I</u>		
3	1,5	450
6	1,5	4 920
9	1,5	1 450
12	1,5	1 170
<u>Peptide IC</u>		
3,6	1,5	1
9	1,5	2 870
12	1,5	1 330
<u>Peptide IE</u>		
3	1,5	1
6	1,5	10
9	1,5	110
12	1,5	330
<u>Peptide 1D</u>		
3-12	1,5	1
<u>Peptide 1A</u>		
3-12	1,5	1
<u>Peptide K₁₀</u>		
3-12	1,5	1
<u>Peptide K₂₀</u>		
3-12	1,5	1-10

Les résultats présentés dans le Tableau II montrent que l'efficacité de transfection dépend de la présence de la séquence signal de 5 localisation nucléaire de la protéine de fibre d'adénovirus.

Il n'y a aucune transfection lorsque l'on retire le domaine NLS (peptide 1D), la polylysine (peptide 1A) ou à la fois le domaine NLS et la zone hydrophobe (peptide K₁₀ et peptide K₂₀). L'élimination du domaine hydrophobe entre la partie NLS et la partie polylysine induit un effet significatif : ce 10 peptide (peptide IE) est environ 30 fois moins efficace que le peptide IC. Même si le peptide 1D est encore capable d'attacher et de condenser l'ADN et d'entrer dans la cellule, il semble cependant incapable de transporter cet ADN dans le noyau.

Il ressort également de ces résultats que lorsque l'on diminue le nombre de lysines présent dans le polymère polylysine (peptide IC), on observe un modeste effet négatif sur l'efficacité de transfection qui peut être contrebalancé en augmentant la quantité de peptide nécessaire pour un transfert efficace.

Le Tableau III ci-après illustre d'autres résultats obtenus avec le peptide I ou le peptide IA, en présence de glycérol ou de PEI et le peptide LII.

TABLEAU III

Peptide (ou PEI) (μg)	ADN ((μg)	RLU/10 s/10 ⁵ cellules x 10 ³
<u>Peptide I</u>		
6	1,5	12 600
6 (+ 10% glycérol)	1,5	34 900
6 (+ 0,1 % DMSO)	1,5	11 320
<u>Peptide LII</u>		
1,5	1,5	0
3	1,5	5 200
6	1,5	2 400
<u>PEI</u>		
3	1,5	66 400
4	1,5	51 200
<u>Peptide IA + PEI</u>		
1,2 μg	1,5	104 000
1,6 μg	1,5	84 800

10 Le vecteur peptidique comprenant le peptide I et la PEI (complexe covalent) est plus efficace que la PEI (polyéthylène imine) seule.

L'efficacité de transfection est significativement supérieure pour ce qui concerne le complexe covalent.

15 On peut dire qu'1 μg de peptide I/PEI donne 54 000-67 000 RLU, tandis qu'1 μg de PEI donne 13 000-22 000 RLU.

- Effet du peptide sur la transfection en présence de liposomes :

Deux liposomes ont été utilisés, le liposome DOTAP et le liposome DOSPER, tous deux commercialisés par Boehringer.

Ils sont constitués de lipides cationiques avec des liaisons esters internes capables d'être dégradées par les estérases ou les lipases cellulaires, ce qui devrait conférer à ces liposomes une cytotoxicité inférieure à celle observée avec d'autres liposomes.

5 Les conditions de transfection des cellules HeLa ont été optimisées pour les liposomes seuls (figure 4). La transfection avec le liposome DOTAP conduit à des efficacités inférieures à celles observées avec le liposome DOSPER ; cependant, les transfections avec le liposome DOTAP ont tendance à présenter un plateau au dessus d'un certain rapport 10 ADN/liposome, tandis que les transfections avec le liposome DOSPER présentent un pic. Pour les transfections simultanées peptide/liposome, l'ordre dans lequel ces composés sont ajoutés est important, puisque l'on observe une efficacité supérieure (augmentation de plusieurs facteurs), lorsque le liposome est d'abord mélangé avec le peptide (et non avec l'ADN) 15 puis lorsque l'ADN plasmidique est ajouté après 15 min d'incubation à température ambiante.

Le Tableau IV ci-après illustre les résultats obtenus.

TABLEAU IV

RLU/10 sec/10⁵ cellules x 10³

DOTAP:ADN	Pas de peptide I	Peptide I:ADN		
		2	4	6
2	9 320 ± 820	28 900 ± 890	30 440 ± 2 360	
4	18 590 ± 570	15 050 ± 340	17 750 ± 750	
6	4 140 ± 640	3 800 ± 770	7 300 ± 150	
DOSPER:ADN	Pas de peptide I	Peptide I:ADN		
4	822 ± 78	1	2	4
5,5	6 880	3 160 ± 760	11 102 ± 2 370	5 140
		18 820	13 760	12 840
Pas de liposome		13 550 ± 2 930		
		35 500 ± 4 800		

20 Les résultats illustrés à ce Tableau IV ont été obtenus dans les conditions suivantes :

des portions du peptide I sont mélangées avec 1,5 µg de plasmide pGL3 dans 300 µl de tampon de dilution pendant 15 min à température ambiante.

Le liposome DOTAP est mélangé avec 1,5 µg de plasmide pGL3 dans un rapport DOTAP/ADN de 2 ou de 4 (v/p), dans 300 µl de tampon de dilution pendant 15 min à température ambiante.

De manière surprenante, ces résultats montrent qu'en l'absence de liposomes, on observe avec le peptide seul dans des rapports peptide/ADN de 4, des résultats supérieurs à ceux observés avec le mélange liposome/peptide.

- Localisation intracellulaire du peptide :

La distribution cellulaire du peptide I fluorescent est suivie en microscopie confocale (figure 5).

Les premières observations, effectuées 2 min après la transfection, montrent une certaine quantité de signal à la périphérie de la cellule.

5 à 10 min après l'addition du peptide, on observe un signal cytoplasmique fort, indiquant l'entrée du peptide dans la cellule.

A 30 min, le signal est également observé dans le noyau et un signal très brillant est observé dans les nucléoles. Ce transfert important vers les nucléoles est particulièrement surprenant.

Les observations réalisées entre 60 et 120 min montrent le passage du peptide à nouveau dans le cytoplasme et à la périphérie de la cellule jusqu'à la perte totale du signal.

Les résultats illustrés à cette figure 4 ont été obtenus avec des concentrations en peptide deux fois plus importantes (40 µg/ml) que celles utilisées pour les essais de transfection d'ADN. Lorsque l'on utilise les concentrations habituelles pour les transfections, l'accumulation de peptides est plus lente, mais suit les mêmes étapes que celles précisées ci-dessus.

- Mécanisme de l'internalisation du peptide :

Un test hémolytique réalisé avec le peptide I sur des érythrocytes donne des résultats négatifs qui montrent que l'interaction de la cellule avec le peptide I n'est pas liée à la formation de pores. Dans la mesure où l'on observe aucune expression de luciférase lorsque les transfections sont réalisées à 4°C, il semble que le mécanisme de l'internalisation du peptide dépend de l'endocytose et implique le cytosquelette.

Pour déterminer s'il existe des sites d'attachement spécifique du peptide I à la membrane plasmatische, des cellules ont été préincubées avec le peptide I à 4°C pendant 2 h, de manière à essayer de saturer les éventuels sites d'attachement du peptide.

Il en est résulté une inhibition totale de la transfection (figure 6), qui indique que cette dernière implique une endocytose récepteur dépendante.

15

- Taille du complexe transfectant :

On peut utiliser la dispersion de la lumière pour mesurer la taille des complexes et leur distribution, s'il y a une formation de population mixte. Dans ces conditions, on peut étudier l'effet du temps d'incubation sur la formation des complexes transfectants.

20

La taille est mesurée immédiatement après le mélange et 1 h après. Les complexes réalisés par mélange du liposome DOTAP avec un plasmide d'ADN ont un diamètre d'environ 115 nm et leur taille ne change pas pendant l'incubation.

25

Les complexes ADN/peptide I sont plus grands et présentent un diamètre d'environ 350-360 nm. De plus, la formation du complexe est un processus dynamique puisque l'on observe une augmentation rapide de la taille en fonction du temps d'incubation lorsque plus de 90 % des complexes atteint un diamètre 660-1100 nm après 1 h.

30

La taille et la distribution des complexes avec le peptide I est similaire quel que soit le rapport peptide/ ADN (de 1 à 8).

L'effet de la taille du complexe sur l'efficacité de la transfection a été étudié en utilisant des complexes préparés en faisant varier la période d'incubation à température ambiante. Les résultats sont illustrés au Tableau V ci-après.

5 TABLEAU VRLU/10 sec/10⁵ cellules x 10³

Peptide:ADN	Temps de préincubation à température ambiante (min)		
<u>Expérimentation 1 :</u>	15	60	120
	2	410	150
	4	2 540	1 900
	6	702	3 460
<u>Expérimentation 2 :</u>	0	15	30
	4	400	3 240
<u>Expérimentation 3 :</u>	0	15	30
	4	1 710	14 550
		23 170	32 175
			6 800

De manière surprenante, avec les complexes selon l'invention, même de très grands agrégats peuvent être transfectés.

10 Pour mesurer la taille de la substance transfectée, des mesures de dispersion de la lumière ont été réalisées avec un laser ion-argon (Spectra Physics 1161) à 488 nm et 150 mW (géométrie de dispersion à 90°). Le spectre est accumulé pendant 200 s en utilisant un corrélateur Malvern 7032 (Malvern Instruments) puis répété 1 h après. Tous les spectres sont en mode homodyne : les amplitudes de la fonction de corrélation d'intensité avec un retard nul sont consistantes avec le facteur de cohérence spécial β obtenu avec une suspension de latex dilué, à savoir $\beta = 0,90$.

15

20 Les rayons hydrodynamiques R_H sont calculés en utilisant la procédure multimodale Malvern (Pike-Ostrowsky), pour caractériser les principaux taux de dégradation de la fonction de corrélation de champs avec la relation de Stokes-Einstein $R_H = k_B T Q^2 / (6\pi\eta\Gamma_1)$, dans laquelle Γ_1 est le taux de dégradation principale, T est la température absolue du bain thermique (298 K), Q le vecteur d'onde de transfert et η la viscosité du solvant.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du 5 technicien en la matière, sans s'écartez du cadre, ni de la portée, de la présente invention.

REVENDICATIONS

1°) Vecteur peptidique de transfection d'une substance chimique sélectionnée dans le groupe constitué par des séquences d'acides nucléiques, des protéines, des peptides et des substances chimiques pharmaco-
5 logiquement actives, caractérisé en ce qu'il contient outre ladite substance chimique, au moins un peptide de transfection dérivant en tout ou en partie d'une fibre d'adénovirus et comportant au moins une zone constituée d'au moins 50 % d'acides hydrophobes sélectionnés dans le groupe constitué par l'alanine, la valine, la phénylalanine, l'isoleucine, la leucine, la proline et la
10 méthionine.

15 2°) Vecteur de transfection selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit peptide de transfection dérive en tout ou en partie d'une fibre d'un adénovirus sélectionné dans le groupe constitué par Ad2, Ad3, Ad4, Ad7, Ad8, Ad9, Ad11, Ad12, Ad15, Ad16, Ad21, Ad40, Ad41, FAV1 (CELO) et
FAV7.

3°) Vecteur de transfection selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit peptide dérive en partie de la protéine Vp3 du virus SV40.

4°) Vecteur de transfection selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que ledit peptide de transfection comprend au moins :

- un segment d'une séquence NLS dérivée d'une fibre d'adénovirus comprenant entre 4 et 5 acides et incluant une séquence sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences suivantes : X₀-Lys-Arg-Val-Arg (X₀KRVR) (SEQ ID NO:1), X₀-Lys-Arg-Ala-Arg (X₀KRAR) (SEQ ID NO:2), X₀-Lys-Arg-Ser-Arg (X₀KRSR) (SEQ ID NO:3), X₀-Lys-Arg-Leu-Arg (X₀KRLR) (SEQ ID NO:4), X₀-Lys-Arg-Thr-Arg (X₀KRTR) (SEQ ID NO:5), X₀-Pro-Lys-Lys-Pro-Arg (X₀PKKPR) (SEQ ID NO:6), dans lesquelles X₀ est nul ou représente Thr (T), Ala (A), Ser-Lys (SK) ou Ser (S), ou un segment de la protéine Vp3 du virus SV40 et notamment la séquence GPNKKKRKL (SEQ ID NO:24),

- une séquence hydrophobe comprenant entre 7 et 50 aminoacides, dérivée d'une fibre d'adénovirus et sélectionnée dans le groupe constitué par au moins l'une des séquences suivantes X_1 -Phe-Asn-Pro-Val-Tyr-Pro-Tyr- X_2 (X_1 FNPVYPY X_2) (SEQ ID NO:7), X_1 -Phe-Asp-Pro-Val-Tyr-Pro-Tyr- X_2 (X_1 FDPVYPY X_2) (SEQ ID NO:8), dans lesquelles :

5 X_1 est nul ou représente une séquence d'au plus 43 aminoacides, de préférence une séquence de 5 à 15 aminoacides, comprenant des aminoacides hydrophobes et/ou polaires et/ou chargés acides, et notamment l'une des séquences suivantes : Leu-Ser-Asp-Ser (LSDS) (SEQ ID NO:9), Leu-
10 Ser-Thr-Ser (LSTS) (SEQ ID NO:10), Leu-Ser-Ser-Ser (LSSS) (SEQ ID NO:11), Pro-Ser-Glu-Asp-Thr (PSEDT) (SEQ ID NO:12), Val-Asp-Asp-Gly (VDDG) (SEQ ID NO:13), Thr-Gln-Tyr-Ala-Glu-Glu-Thr-Glu-Glu-Asn-Asp-Asp (TQYAEETEENDD) (SEQ ID NO:14) ou X_3 -Glu-Asp-Asp (X_3 EDD) (SEQ ID NO:15) dans laquelle X_3 représente Ala (A), Val (V), Leu (L), Phe (F) ou Ile (I)

15 et

X_2 est nul ou représente une séquence d'au plus 43 aminoacides, de préférence une séquence de 5 à 15 aminoacides, comprenant des aminoacides hydrophobes et/ou polaires et/ou chargés, et notamment l'une des séquences suivantes : Glu-Asp-Glu-Ser (EDES) (SEQ ID NO:16), Asp-Thr-
20 Glu-Thr (DTET) (SEQ ID NO:17), Asp-Ala-Asp-Asn (DADN) (SEQ ID NO:18), Asp-Pro-Phe-Asp (DPFD) (SEQ ID NO:19), Gly-Tyr-Ala-Arg (GYAR) (SEQ ID NO:20), Glu-His-Tyr-Asn (EHYN) (SEQ ID NO:21), Asp-Thr-Ser-Ser (DTSS) (SEQ ID NO:22) ou Asp-Thr-Phe-Ser (DTFS) (SEQ ID NO:23) et

25 - une séquence polymérique d'aminoacides basiques ou une séquence polymérique cationique ou un polyalcool.

 5°) Vecteur de transfection selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il comprend au moins :

 - un segment d'une séquence NLS dérivée d'une fibre d'adénovirus comprenant entre 4 et 5 aminoacides et incluant une séquence sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences suivantes : X_0 -Lys-

Arg-Val-Arg (X_0 KRVR) (SEQ ID NO:1), X_0 -Lys-Arg-Ala-Arg (X_0 KRAR) (SEQ ID NO:2), X_0 -Lys-Arg-Ser-Arg (X_0 KRSR) (SEQ ID NO:3), X_0 -Lys-Arg-Leu-Arg (X_0 -KRLR) (SEQ ID NO:4), X_0 -Lys-Arg-Thr-Arg (X_0 KRTR) (SEQ ID NO:5), X_0 -Pro-Lys-Lys-Pro-Arg (X_0 PKKPR) (SEQ ID NO:6), dans lesquelles X_0 est nul ou 5 représente Thr (T), Ala (A), Ser-Lys (SK) ou Ser (S), ou un segment de la protéine Vp3 du virus SV40 et notamment la séquence GPNKKKRKL (SEQ ID NO:24),

- une séquence hydrophobe comprenant entre 7 et 50 amino-acides, dérivée d'une fibre d'adénovirus et sélectionnée dans le groupe constitué par au moins l'une des séquences suivantes X_1 -Phe-Asn-Pro-Val-Tyr-Pro-Tyr- X_2 (X_1 FNPVYPY X_2) (SEQ ID NO:7), X_1 -Phe-Asp-Pro-Val-Tyr-Pro-Tyr- X_2 (X_1 FDPVYPY X_2) (SEQ ID NO:8), dans lesquelles :

X_1 est nul ou représente une séquence d'au plus 43 amino-acides, de préférence une séquence de 5 à 15 aminoacides, comprenant des 15 aminoacides hydrophobes et/ou polaires et/ou chargés acides, et notamment l'une des séquences suivantes : Leu-Ser-Asp-Ser (LSDS) (SEQ ID NO:9), Leu-Ser-Thr-Ser (LSTS) (SEQ ID NO:10), Leu-Ser-Ser-Ser (LSSS) (SEQ ID NO:11), Pro-Ser-Glu-Asp-Thr (PSEDT) (SEQ ID NO:12), Val-Asp-Asp-Gly (VDDG) (SEQ ID NO:13), Thr-Gln-Tyr-Ala-Glu-Glu-Thr-Glu-Glu-Asn-Asp-Asp 20 (TQYAEETEENDD) (SEQ ID NO:14) ou X_3 -Glu-Asp-Asp (X_3 EDD) (SEQ ID NO:15) dans laquelle X_3 représente Ala (A), Val (V), Leu (L), Phe (F) ou Ile (I) et

X_2 est nul ou représente une séquence d'au plus 43 amino-acides, de préférence une séquence de 5 à 15 aminoacides, comprenant des 25 aminoacides hydrophobes et/ou polaires et/ou chargés, et notamment l'une des séquences suivantes : Glu-Asp-Glu-Ser (EDES) (SEQ ID NO:16), Asp-Thr-Glu-Thr (DTET) (SEQ ID NO:17), Asp-Ala-Asp-Asn (DADN) (SEQ ID NO:18), Asp-Pro-Phe-Asp (DPFD) (SEQ ID NO:19), Gly-Tyr-Ala-Arg (GYAR) (SEQ ID NO:20), Glu-His-Tyr-Asn (EHYN) (SEQ ID NO:21), Asp-Thr-Ser-Ser (DTSS) 30 (SEQ ID NO:22) ou Asp-Thr-Phe-Ser (DTFS) (SEQ ID NO:23), lequel peptide

de transfection est associé à une séquence polymérique d'aminoacides basiques, à un polymère cationique ou à un polyalcool.

5 6°) Vecteur de transfection selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que la séquence polymérique d'aminoacides basiques comprend entre 10 et 50 résidus d'aminoacides, sélectionnés dans le groupe constitué par la lysine, l'arginine et l'ornithine.

10 7°) Vecteur de transfection selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que la séquence polymérique cationique est sélectionnée dans le groupe constitué par les amines polymériques.

15 8°) Vecteur de transfection selon l'une quelconque des revendications 4 à 7, caractérisé en ce que la séquence NLS est à l'extrémité N-terminale du peptide de transfection et la séquence polymérique d'aminoacides basiques est à l'extrémité C-terminale dudit peptide de transfection.

20 9°) Vecteur de transfection selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que lorsque la substance chimique est un acide nucléique, le rapport peptide de transfection/acide nucléique est compris entre 0,3:1 et 15:1, de manière préférée entre 2:1 et 6:1, de préférence entre 4:1 et 6:1.

25 10°) Vecteur de transfection selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce qu'il est associé à un ligand de ciblage.

11°) Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle est essentiellement constituée par un vecteur de transfection selon l'une quelconque des revendications 1 à 10 et un véhicule convenable sélectionné dans le groupe constitué par les sels biliaires, les antiprotéases, les cyclodextrines et leurs dérivés, les antiseptiques et les polyols.

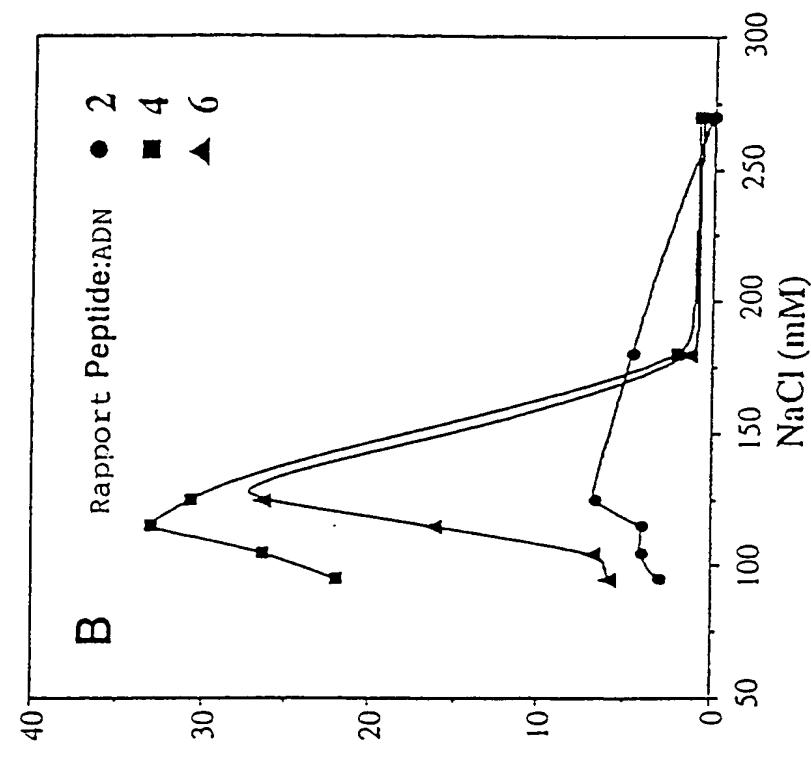
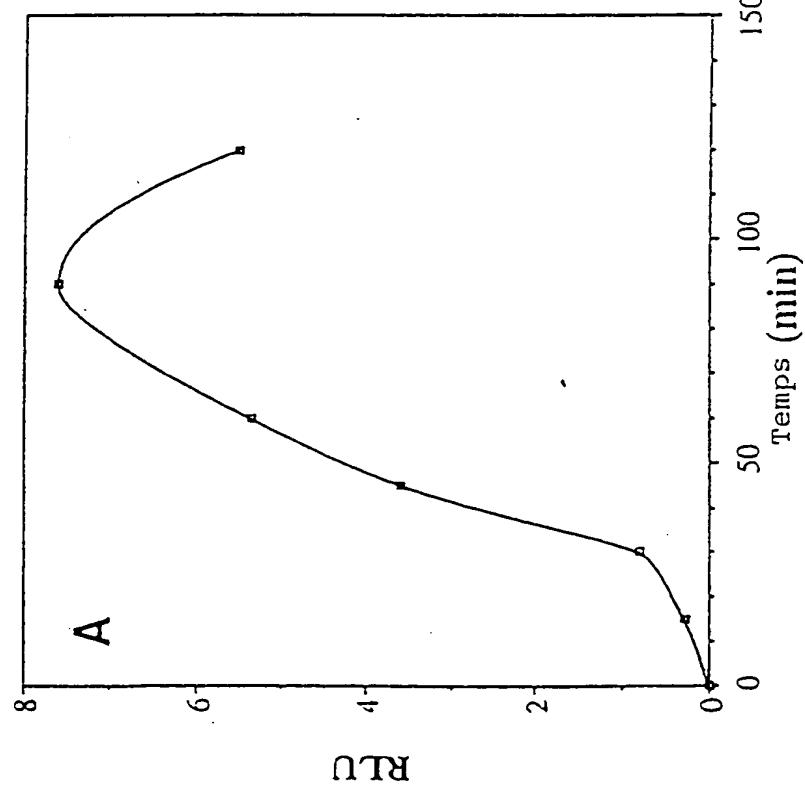
30 10°) Procédé de transfection *in vitro* de cellules eucaryotes avec une substance chimique sélectionnée dans le groupe constitué par des séquences d'acides nucléiques, des protéines, des peptides et des substances chimiques pharmacologiquement actives, caractérisé en ce qu'il comprend la

mise en contact et l'incubation d'un vecteur de transfection selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, dans un tampon de dilution comprenant du NaCl 100-150 mM avec des cellules eucaryotes pendant 15 à 120 minutes à température ambiante, le rapport substance chimique à transfacter sur peptide de transfection étant compris entre 0,3:1 et 15:1, de manière préférée entre 2:1 et 6:1, de préférence entre 4:1 et 6:1.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

1 / 7

Peptide/NaCl

FIGURE 1

526 Rec'd PCT/PTO 02 MAY 2000

THIS PAGE BLANK (USPTO)

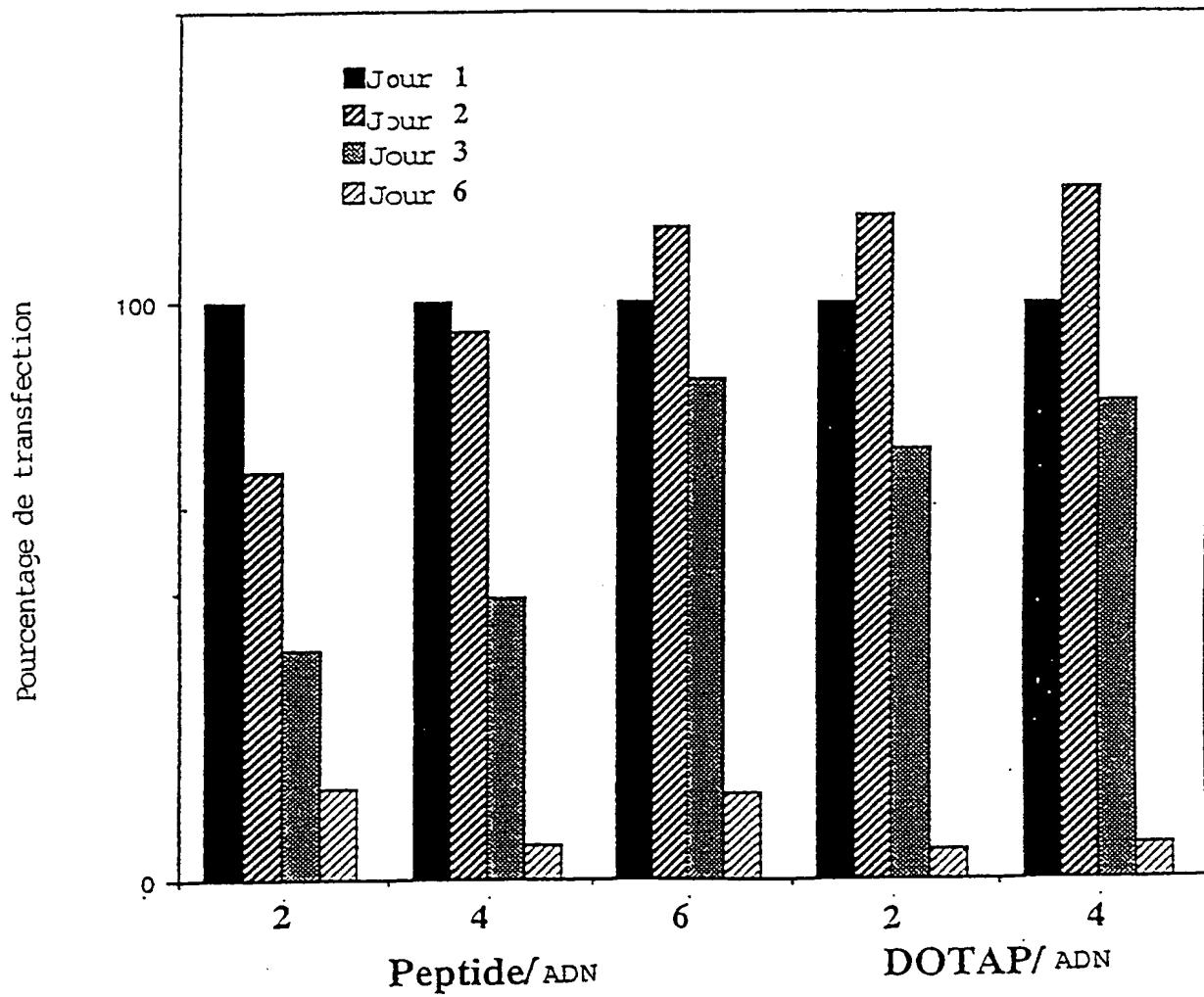


FIGURE 2

526 Rec'd PCX USPTO 02 MAY 2000

THIS PAGE BLANK (USPTO)

3 / 7

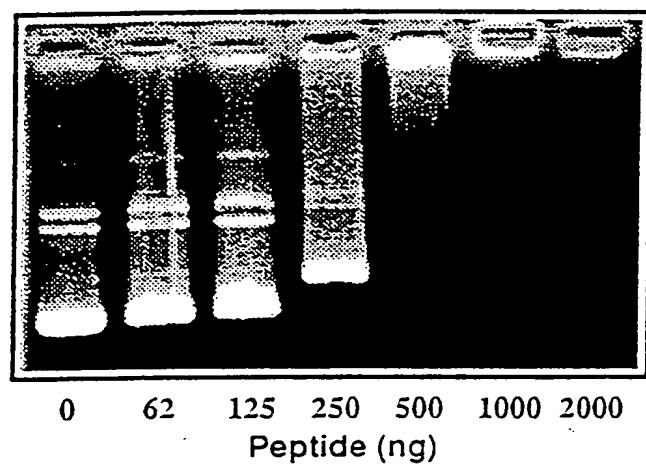


FIGURE 3

526 Rec'd:USPTO 02 MAY 2000

THIS PAGE BLANK (USPTO)

4/7

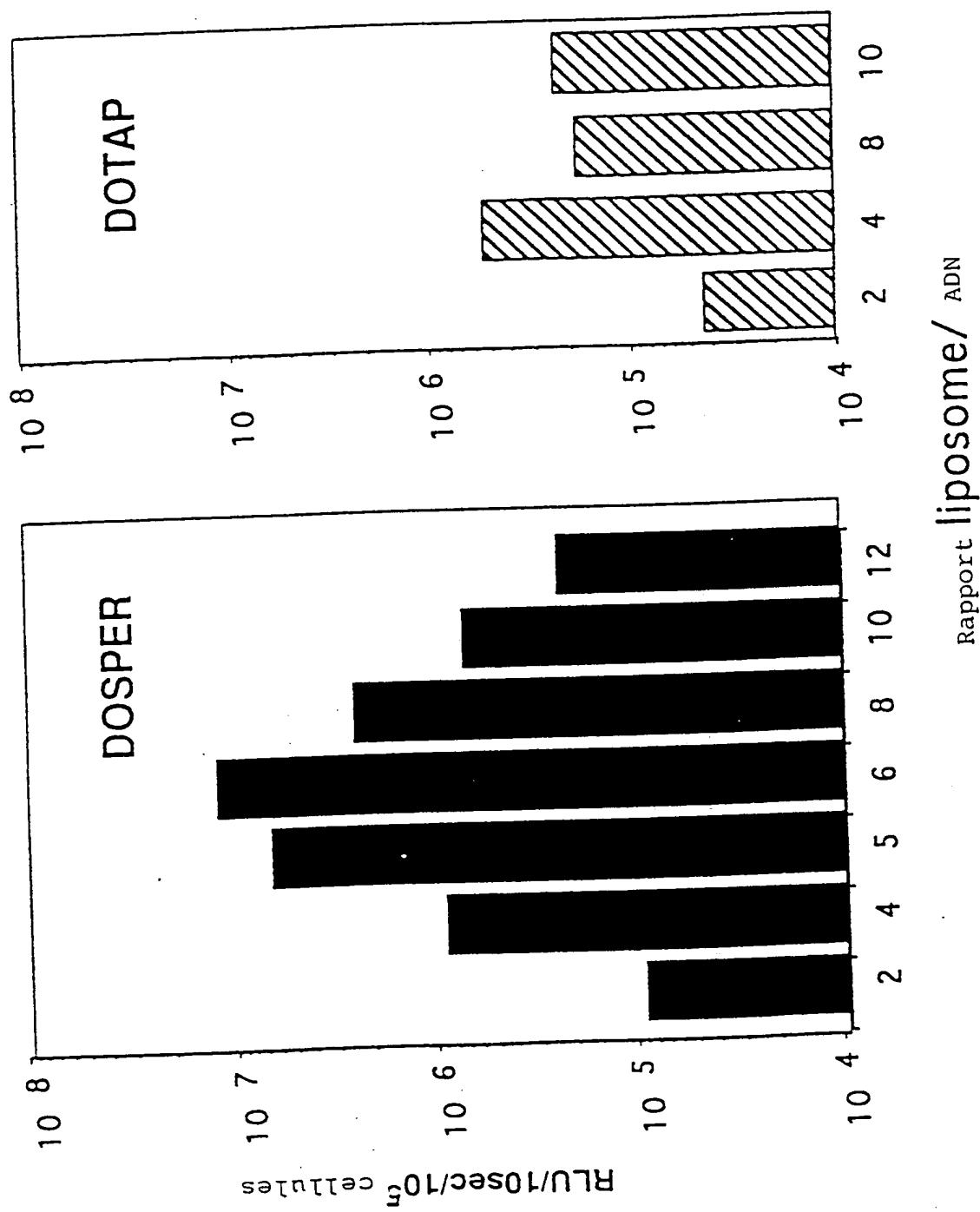
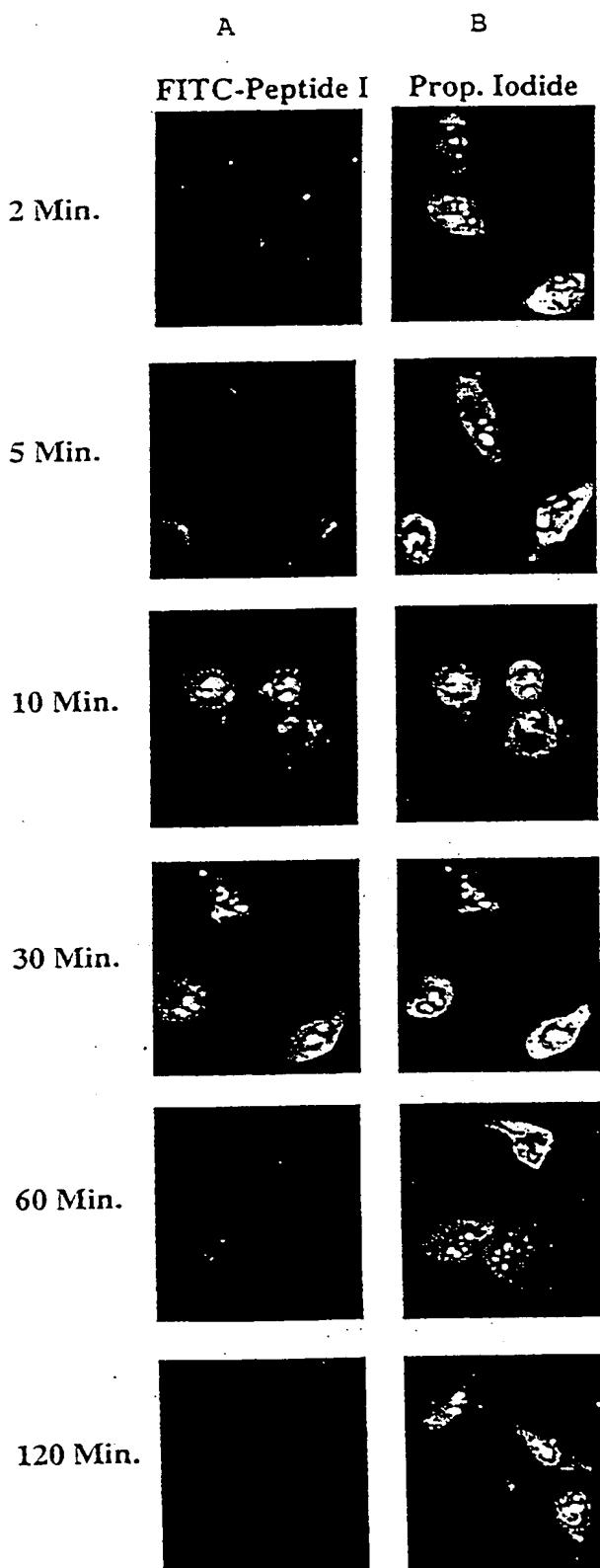


FIGURE 4

526 Rec'd PCT/USPTO 02 MAY 2000

THIS PAGE BLANK (USPTO)

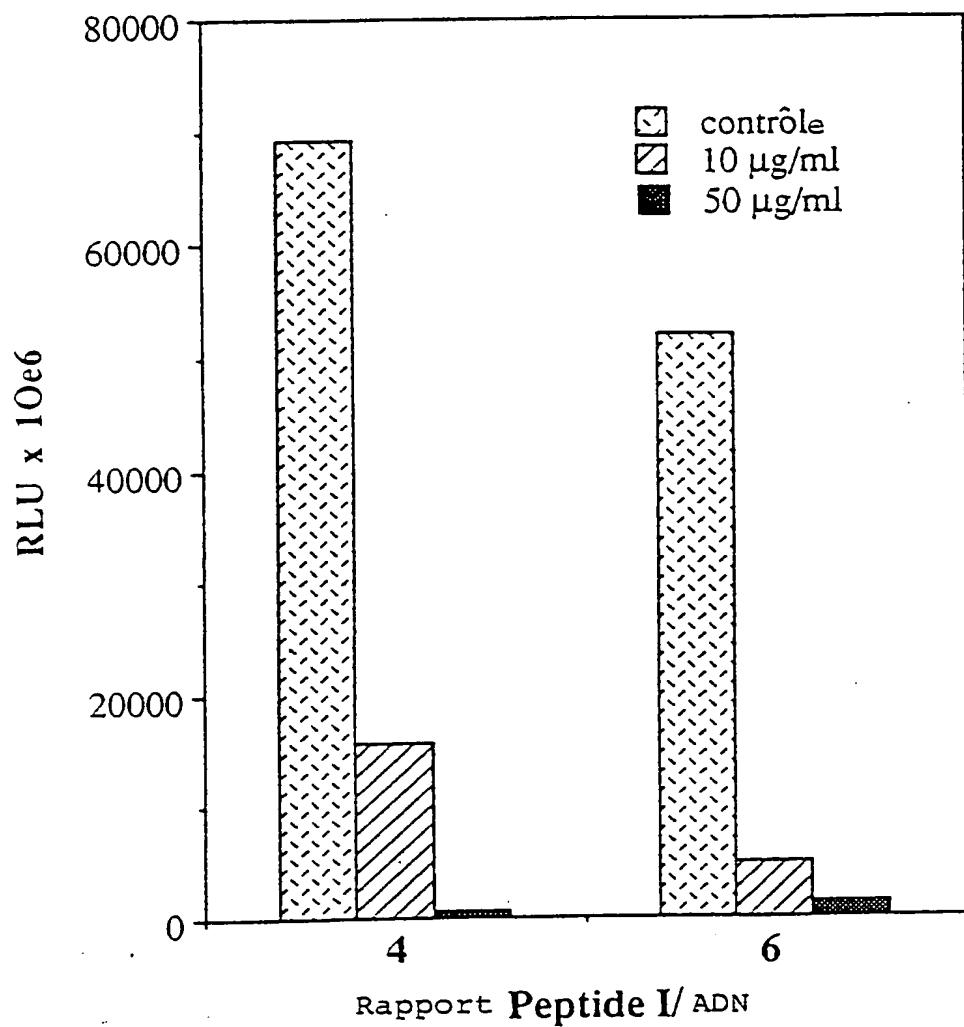
5/7

FIGURE 5

526 Rec'd 02 MAY 2000

THIS PAGE BLANK (USPTO)

6/7

FIGURE 6

526 Rec'd PCT/P 02 MAY 2000

THIS PAGE BLANK (USPTO)

FIGURE 7

526 Rec'd PCT/PTO 02 MAY 2000

THIS PAGE BLANK (USPTO)

526 02 MAY 2000

LISTAGE DE SEQUENCE

<110> CHROBOCZEK, Jadwiga
FENDER, Pascal
COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE-CNRS

<120> VECTEUR PEPTIDIQUE DE TRANSFECTION, COMPOSITION LE
CONTENANT ET LEURS APPLICATIONS.

<130> BLOcp263/34P

<140>
<141>

<150> 97 13771
<151> 1997-11-03

<160> 24

<170> PatentIn Vers. 2.0

<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> Adenovirus

<400> 1
Xaa Lys Arg Val Arg
1 5

<210> 2
<211> 5
<212> PRT
<213> Adenovirus

<400> 2
Xaa Lys Arg Ala Arg
1 5

<210> 3
<211> 5
<212> PRT
<213> Adenovirus

<400> 3
Xaa Lys Arg Ser Arg
1 5

<210> 4
<211> 5
<212> PRT
<213> Adenovirus

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<400> 4
Xaa Lys Arg Leu Arg
1 5

<210> 5
<211> 5
<212> PRT
<213> Adenovirus

<400> 5
Xaa Lys Arg Thr Arg
1 5

<210> 6
<211> 6
<212> PRT
<213> Adenovirus

<400> 6
Xaa Pro Lys Lys Pro Arg
1 5

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> Adenovirus

<400> 7
Xaa Phe Asn Pro Val Tyr Pro Tyr Xaa
1 5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Adenovirus

<400> 8
Xaa Phe Asp Pro Val Tyr Pro Tyr Xaa
1 5

<210> 9
<211> 4
<212> PRT
<213> Adenovirus

<400> 9
Leu Ser Asp Ser
1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<210> 10
<211> 4
<212> PRT
<213> Adenovirus

<400> 10
Leu Ser Thr Ser
1

<210> 11
<211> 4
<212> PRT
<213> Adenovirus

<400> 11
Leu Ser Ser Ser
1

<210> 12
<211> 5
<212> PRT
<213> Adenovirus

<400> 12
Pro Ser Glu Asp Thr
1 5

<210> 13
<211> 4
<212> PRT
<213> Adenovirus

<400> 13
Val Asp Asp Gly
1

<210> 14
<211> 12
<212> PRT
<213> Adenovirus

<400> 14
Thr Gln Tyr Ala Glu Glu Thr Glu Glu Asn Asp Asp
1 5 10

<210> 15
<211> 4
<212> PRT
<213> Adenovirus

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<400> 15
Xaa Glu Asp Asp
1

<210> 16
<211> 4
<212> PRT
<213> Adenovirus

<400> 16
Glu Asp Glu Ser
1

<210> 17
<211> 4
<212> PRT
<213> Adenovirus

<400> 17
Asp Thr Glu Thr
1

<210> 18
<211> 4
<212> PRT
<213> Adenovirus

<400> 18
Asp Ala Asp Asn
1

<210> 19
<211> 4
<212> PRT
<213> Adenovirus

<400> 19
Asp Pro Phe Asp
1

<210> 20
<211> 4
<212> PRT
<213> Adenovirus

<400> 20
Gly Tyr Ala Arg
1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<210> 21
<211> 4
<212> PRT
<213> Adenovirus

<400> 21
Glu His Tyr Asn
1

<210> 22
<211> 4
<212> PRT
<213> Adenovirus

<400> 22
Asp Thr Ser Ser
1

<210> 23
<211> 4
<212> PRT
<213> Adenovirus

<400> 23
Asp Thr Phe Ser
1

<210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus SV40

<400> 24
Gly Pro Asn Lys Lys Lys Arg Lys Leu
1 5

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 98/02344A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/87 C12N15/62 C07K14/025 C07K14/075 A61K47/48
A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FENDER P ET AL: "Adenovirus dodecahedron, a new vector for human gene transfer" NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 15, January 1997, pages 52-56. XP002071995 see the whole document, and particularly page 53, column 2, line 9 - line 11 ---	1,2,4-9, 11,12
X	WO 97 18317 A (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE ;CENTRE NAT RECH SCIENT (FR); CHROBO) 22 May 1997 cited in the application see page 22, line 10 ---	1,2,4-9, 11,12 -/-

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 March 1999

Date of mailing of the international search report

01/04/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patenttaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Lonnoy, O

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 98/02344

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 94 17832 A (SCRIPPS RESEARCH INST ; NEMEROW GLEN R (US); WICKHAM THOMAS J (US)) 18 August 1994 see page 80, line 30 - line 34; figure 3 ---	
A	WO 97 20575 A (UNIV ALABAMA AT BIRMINGHAM RES) 12 June 1997 ---	
A	HONG J S ET AL: "THE AMINO TERMINUS OF THE ADENOVIRUS FIBER PROTEIN ENCODES THE NUCLEAR LOCALIZATION SIGNAL" VIROLOGY, vol. 18, no. 2, December 1991, pages 758-767, XP000607409 ---	
A	CLEVER J ET AL: "Simian virus 40 Vp2/3 small structural proteins harbor their own nuclear transport signal" VIROLOGY, vol. 181, no. 1, March 1991, pages 78-90, XP002097033 see abstract -----	

INTERNATIO

SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 98/02344

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

see supplementary sheet CONTINUATION OF INFORMATION PCT/ISA/210

2. Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest



The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.



No protest accompanied the payment of additional search fees.

In view of the extremely wide scope of the Markush-type claims, the international search was carried out with due regard to PCT Search Guidelines, Chapter III, paragraphs 2.1 and 2.3 in combination with 3.7 and PCT Rule 33.3, particular attention being paid to the inventive concept as illustrated by the peptides of Table 1 and the use of a transfection peptide deriving wholly or partly from the adenovirus fiber as transfection vector. The internal search can be considered to be as exhaustive as is possible and reasonable inasmuch as the integral subject matter of the claims has been taken into consideration.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 98/02344

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9718317 A	22-05-1997	FR	2741087 A	16-05-1997
		FR	2747681 A	24-10-1997
		EP	0861329 A	02-09-1998
WO 9417832 A	18-08-1994	AU	6133394 A	29-08-1994
WO 9720575 A	12-06-1997	AU	1282297 A	27-06-1997
		CA	2237059 A	12-06-1997
		EP	0866721 A	30-09-1998

THIS PAGE BLANK (USPTO)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De... Internationale No
PCT/FR 98/02344

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C12N15/87 C12N15/62 C07K14/025 C07K14/075 A61K47/48
A61K48/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 6 C12N C07K A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porte la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Categorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	FENDER P ET AL: "Adenovirus dodecahedron, a new vector for human gene transfer" NATURE BIOTECHNOLOGY., vol. 15, janvier 1997, pages 52-56, XP002071995 voir le document en entier, et particulièrement page 53, colonne 2, ligne 9 - ligne 11 ---	1,2,4-9, 11,12
X	WO 97 18317 A (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE ;CENTRE NAT RECH SCIENT (FR); CHROBO) 22 mai 1997 cité dans la demande voir page 22, ligne 10 ---	1,2,4-9, 11,12 -/-

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- 3 document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

18 mars 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

01/04/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Lonnoy, O

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

le Internationale No

CT/FR 98/02344

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Categorie	Identification des documents cites, avec le cas echeant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visees
A	WO 94 17832 A (SCRIPPS RESEARCH INST ;NEMEROW GLEN R (US); WICKHAM THOMAS J (US)) 18 août 1994 voir page 80, ligne 30 - ligne 34; figure 3 ---	
A	WO 97 20575 A (UNIV ALABAMA AT BIRMINGHAM RES) 12 juin 1997 ---	
A	HONG J S ET AL: "THE AMINO TERMINUS OF THE ADENOVIRUS FIBER PROTEIN ENCODES THE NUCLEAR LOCALIZATION SIGNAL" VIROLOGY, vol. 18, no. 2, décembre 1991, pages 758-767, XP000607409 ---	
A	CLEVER J ET AL: "Simian virus 40 Vp2/3 small structural proteins harbor their own nuclear transport signal" VIROLOGY, vol. 181, no. 1, mars 1991, pages 78-90, XP002097033 voir abrégé -----	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n

PCT/FR 98/02344

Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2(a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. Les revendications n°s se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir: voir feuille supplémentaire SUITE DES RENSEIGNEMENTS PCT/ISA/210
2. Les revendications n°s se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
3. Les revendications n°s sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prétaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°s
4. Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°s

Remarque quant à la réserve

Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.

Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/SAV 210

Eu égard à l'étendue extrême des revendications du type Markush, la recherche internationale a été effectuée en tenant dûment compte des Directives concernant la recherche selon le PCT (PCT/GL/2), C-III, paragraphe 2.1, 2.3 en combinaison avec 3.7 et de la règle 33.3 PCT, une attention particulière étant portée au concept inventif tel qu'illustré par les peptides du tableau 1 et l'usage d'un peptide de transfection dérivant en tout ou en partie de la fibre d'adénovirus comme vecteur de transfection. La recherche internationale peut être considérée comme complète dans la mesure du possible et raisonnable dans ce sens qu'elle a englobé l'objet des revendications dans son intégralité.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Document Internationale No

PCT/FR 98/02344

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
WO 9718317 A	22-05-1997	FR	2741087 A	16-05-1997
		FR	2747681 A	24-10-1997
		EP	0861329 A	02-09-1998
WO 9417832 A	18-08-1994	AU	6133394 A	29-08-1994
WO 9720575 A	12-06-1997	AU	1282297 A	27-06-1997
		CA	2237059 A	12-06-1997
		EP	0866721 A	30-09-1998

THIS PAGE BLANK (USPTO)

- Paramètres intervenant sur l'efficacité de la transfection par le peptide selon l'invention :

Les peptides selon l'invention comprennent essentiellement 3 domaines, le signal de localisation nucléaire, le domaine hydrophobe et le polymère basique.

Pour étudier l'effet de la structure du peptide sur la transfection d'ADN, une série de peptides dans lesquels les différentes parties du peptide I ont été éliminées, dont les séquences sont illustrées au Tableau I ci-après :

TABLEAU I

Peptide	Séquences*
I	A K R A R L S T S F N P V Y P Y E D E S - K ₂₀ = SEQ ID NO:2 + SEQ ID NO:10 + SEQ ID NO:7 + SEQ ID NO:16-K ₂₀
IC	A K R A R L S T S F N P V Y P Y E D E S - K ₁₀ = SEQ ID NO:2 + SEQ ID NO:10 + SEQ ID NO:7 + SEQ ID NO:16-K ₁₀
IE	A K R A R L S T S E D E S - K ₁₀ = SEQ ID NO:2 + SEQ ID NO:10 + SEQ ID NO:16-K ₁₀
ID	L S T S F N P V Y P Y E D E S - K ₂₀ = SEQ ID NO:10 + SEQ ID NO:7 + SEQ ID NO:16-K ₂₀
IA	A K R A R L S T S F N P V Y P Y E D E S = SEQ ID NO:2 + SEQ ID NO:10 + SEQ ID NO:7 + SEQ ID NO:16
LII	A K R A R L S T S F N P V Y P Y E D E S - K A K R A R L S T S F N P V Y P Y E D E S - K (pour chaque branche : SEQ ID NO:2 + SEQ ID NO:10 + SEQ ID NO:7 + SEQ ID NO:16)

* dans lesquelles X₀ = A.

Les résultats obtenus avec ces différents peptides sont illustrés au Tableau II ci-après.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

REVENDICATIONS

1°) Vecteur peptidique de transfection d'une substance chimique sélectionnée dans le groupe constitué par des séquences d'acides nucléiques, des protéines, des peptides et des substances chimiques pharmacologiquement actives, caractérisé en ce qu'il contient outre ladite substance chimique, au moins un peptide de transfection dérivant en tout ou en partie d'une fibre d'un adénovirus sélectionné dans le groupe constitué par Ad2, Ad3, Ad4, Ad7, Ad8, Ad9, Ad11, Ad12, Ad15, Ad16, Ad21, Ad40, Ad41, FAV1 (CELO) et FAV7, lequel peptide de transfection comprend au moins :

10 - un segment d'une séquence NLS dérivée d'une fibre d'adénovirus comprenant entre 4 et 5 aminoacides et incluant une séquence sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences suivantes : X₀-Lys-Arg-Val-Arg (X₀KRVR) (SEQ ID NO:1), X₀-Lys-Arg-Ala-Arg (X₀KRAR) (SEQ ID NO:2), X₀-Lys-Arg-Ser-Arg (X₀KRSR) (SEQ ID NO:3), X₀-Lys-Arg-Leu-Arg (X₀KRLR) (SEQ ID NO:4), X₀-Lys-Arg-Thr-Arg (X₀KRTR) (SEQ ID NO:5), X₀-Pro-Lys-Lys-Pro-Arg (X₀PKKPR) (SEQ ID NO:6), dans lesquelles X₀ est nul ou représente Thr (T), Ala (A), Ser-Lys (SK) ou Ser (S), ou un segment de la protéine Vp3 du virus SV40 et notamment la séquence GPNKKKRKL (SEQ ID NO:24),

20 - une séquence hydrophobe comprenant entre 7 et 50 aminoacides, dérivée d'une fibre d'adénovirus et sélectionnée dans le groupe constitué par au moins l'une des séquences suivantes X₁-Phe-Asn-Pro-Val-Tyr-Pro-Tyr-X₂ (X₁FNPVYPYX₂) (SEQ ID NO:7), X₁-Phe-Asp-Pro-Val-Tyr-Pro-Tyr-X₂ (X₁FDPVYPYX₂) (SEQ ID NO:8), dans lesquelles :

25 X₁ est nul ou représente une séquence d'au plus 43 aminoacides, de préférence une séquence de 5 à 15 aminoacides, comprenant des aminoacides hydrophobes et/ou polaires et/ou chargés acides, et notamment l'une des séquences suivantes : Leu-Ser-Asp-Ser (LSDS) (SEQ ID NO:9), Leu-Ser-Thr-Ser

1/2/2022 MODIF

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(LSTS) (SEQ ID NO:10), Leu-Ser-Ser-Ser (LSSS) (SEQ ID NO:11), Pro-Ser-Glu-Asp-Thr (PSEDT) (SEQ ID NO:12), Val-Asp-Asp-Gly (VDDG) (SEQ ID NO:13), Thr-Gln-Tyr-Ala-Glu-Glu-Thr-Glu-Glu-Asn-Asp-Asp (TQYAEETEENDD) (SEQ ID NO:14) ou X_3 -Glu-Asp-Asp (X_3 EDD) (SEQ ID NO:15) dans laquelle X_3 représente Ala (A), Val (V), Leu (L), Phe (F) ou Ile (I) et

5 X_2 est nul ou représente une séquence d'au plus 43 aminoacides, de préférence une séquence de 5 à 15 aminoacides, comprenant des aminoacides hydrophobes et/ou polaires et/ou chargés, et notamment l'une des séquences suivantes : Glu-Asp-Glu-Ser (EDES) (SEQ ID NO:16), Asp-Thr-Glu-Thr (DTET) 10 (SEQ ID NO:17), Asp-Ala-Asp-Asn (DADN) (SEQ ID NO:18), Asp-Pro-Phe-Asp (DPFD) (SEQ ID NO:19), Gly-Tyr-Ala-Arg (GYAR) (SEQ ID NO:20), Glu-His-Tyr-Asn (EHYN) (SEQ ID NO:21), Asp-Thr-Ser-Ser (DTSS) (SEQ ID NO:22) ou Asp-Thr-Phe-Ser (DTFS) (SEQ ID NO:23) et

15 - une séquence polymérique d'aminoacides basiques ou une séquence polymérique cationique ou un polyalcool, pour une utilisation comme médicament.

20 2°) Vecteur peptidique de transfection d'une substance chimique sélectionnée dans le groupe constitué par des séquences d'acides nucléiques, des protéines, des peptides et des substances chimiques pharmacologiquement actives, caractérisé en ce qu'il contient outre ladite substance chimique, au moins un peptide de transfection dérivant en tout ou en partie d'une fibre d'un adénovirus sélectionné dans le groupe constitué par Ad2, Ad3, Ad4, Ad7, Ad8, Ad9, Ad11, Ad12, Ad15, Ad16, Ad21, Ad40, Ad41, FAV1 (CELO) et FAV7, lequel peptide de transfection comprend au moins :

25 - un segment d'une séquence NLS dérivée d'une fibre d'adénovirus comprenant entre 4 et 5 aminoacides et incluant une séquence sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences suivantes : X_0 -Lys-Arg-

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Val-Arg (X_0 KRVR) (SEQ ID NO:1), X_0 -Lys-Arg-Ala-Arg (X_0 KRAR) (SEQ ID NO:2), X_0 -Lys-Arg-Ser-Arg (X_0 KRSR) (SEQ ID NO:3), X_0 -Lys-Arg-Leu-Arg (X_0 KRLR) (SEQ ID NO:4), X_0 -Lys-Arg-Thr-Arg (X_0 KRTR) (SEQ ID NO:5), X_0 -Pro-Lys-Lys-Pro-Arg (X_0 PKKPR) (SEQ ID NO:6), dans lesquelles X_0 est nul ou représente Thr (T), Ala (A), Ser-Lys (SK) ou Ser (S), ou un segment de la protéine Vp3 du virus SV40 et notamment la séquence GPNKKKRKL (SEQ ID NO:24),

- une séquence hydrophobe comprenant entre 7 et 50 amino-acides, dérivée d'une fibre d'adénovirus et sélectionnée dans le groupe constitué par au moins l'une des séquences suivantes X_1 -Phe-Asn-Pro-Val-Tyr-Pro-Tyr- X_2 (X₁FNPVYPYX₂) (SEQ ID NO:7), X_1 -Phe-Asp-Pro-Val-Tyr-Pro-Tyr- X_2 (X₁FDPVYPYX₂) (SEQ ID NO:8), dans lesquelles :

X_1 est nul ou représente une séquence d'au plus 43 aminoacides, de préférence une séquence de 5 à 15 aminoacides, comprenant des aminoacides hydrophobes et/ou polaires et/ou chargés acides, et notamment l'une des séquences suivantes : Leu-Ser-Asp-Ser (LSDS) (SEQ ID NO:9), Leu-Ser-Thr-Ser (LSTS) (SEQ ID NO:10), Leu-Ser-Ser-Ser (LSSS) (SEQ ID NO:11), Pro-Ser-Glu-Asp-Thr (PSEDT) (SEQ ID NO:12), Val-Asp-Asp-Gly (VDDG) (SEQ ID NO:13), Thr-Gln-Tyr-Ala-Glu-Glu-Thr-Glu-Glu-Asn-Asp-Asp (TQYAEETEENDD) (SEQ ID NO:14) ou X_3 -Glu-Asp-Asp (X_3 EDD) (SEQ ID NO:15) dans laquelle X_3 représente Ala (A), Val (V), Leu (L), Phe (F) ou Ile (I) et

X_2 est nul ou représente une séquence d'au plus 43 aminoacides, de préférence une séquence de 5 à 15 aminoacides, comprenant des aminoacides hydrophobes et/ou polaires et/ou chargés, et notamment l'une des séquences suivantes : Glu-Asp-Glu-Ser (EDES) (SEQ ID NO:16), Asp-Thr-Glu-Thr (DTET) (SEQ ID NO:17), Asp-Ala-Asp-Asn (DADN) (SEQ ID NO:18), Asp-Pro-Phe-Asp (DPFD) (SEQ ID NO:19), Gly-Tyr-Ala-Arg (GYAR) (SEQ ID NO:20), Glu-His-Tyr-Asn (EHYN) (SEQ ID NO:21), Asp-Thr-Ser-Ser (DTSS) (SEQ ID NO:22) ou Asp-

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Thr-Phe-Ser (DTFS) (SEQ ID NO:23), lequel peptide de transfection est associé à une séquence polymérique d'aminoacides basiques, à un polymère cationique ou à un polyalcool,
pour une utilisation comme médicament.

5 3°) Vecteur de transfection selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce que la séquence polymérique d'aminoacides basiques comprend entre 10 et 50 résidus d'aminoacides, sélectionnés dans le groupe constitué par la lysine, l'arginine et l'ornithine.

10 4°) Vecteur de transfection selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la séquence polymérique cationique est sélectionnée dans le groupe constitué par les amines polymériques.

15 5°) Vecteur de transfection selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la séquence NLS est à l'extrémité N-terminale du peptide de transfection et la séquence polymérique d'aminoacides basiques est à l'extrémité C-terminale dudit peptide de transfection.

6°) Vecteur de transfection selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que lorsque la substance chimique est un acide nucléique, le rapport peptide de transfection/acide nucléique est compris entre 0,3:1 et 15:1, de manière préférée entre 2:1 et 6:1, de préférence entre 4:1 et 6:1.

20 7°) Vecteur de transfection selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il est associé à un ligand de ciblage.

25 8°) Composition, caractérisée en ce qu'elle est essentiellement constituée par un vecteur de transfection selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 et un véhicule convenable sélectionné dans le groupe constitué par les sels biliaires, les antiprotéases, les cyclodextrines et leurs dérivés, les antiseptiques et les polyols, pour une utilisation comme médicament.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

9°) Procédé de transfection *in vitro* de cellules eucaryotes avec une substance chimique sélectionnée dans le groupe constitué par des séquences d'acides nucléiques, des protéines, des peptides et des substances chimiques pharmacologiquement actives, caractérisé en ce qu'il comprend la mise en contact et l'incubation d'un vecteur de transfection selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, dans un tampon de dilution comprenant du NaCl 100-150 mM avec des cellules eucaryotes pendant 15 à 120 minutes à température ambiante, le rapport substance chimique à transfacter sur peptide de transfection étant compris entre 0,3:1 et 15:1, de manière préférée entre 2:1 et 6:1, de préférence entre 4:1 et 6:1.

10 10°) Vecteur peptidique de transfection d'une substance chimique sélectionnée dans le groupe constitué par des séquences d'acides nucléiques, des protéines, des peptides et des substances chimiques pharmacologiquement actives, caractérisé en ce qu'il contient outre ladite substance chimique, au moins un peptide de transfection qui comprend :

- un segment d'une séquence NLS constitué par la séquence ID NO:2,
- un segment d'une séquence constitué par la séquence ID NO:10,
- un segment d'une séquence constitué par la séquence ID NO:16,

20 et

- une polylysine,

pour une utilisation comme médicament.

FEUILLE MODIFIÉE

THIS PAGE BLANK (USPTO)

REPLACED BY
ART 34 AMDT

- 17 -

- Parameters involved in the efficiency of transfection with the peptide according to the invention:

The peptides according to the invention 5 comprise essentially 3 domains: the nuclear localization signal, the hydrophobic domain and the basic polymer.

To study the effect of the structure of the peptide on the transfection of DNA, a series of 10 peptides [lacuna], in which the various portions of peptide I have been removed, whose sequences are illustrated in Table I below:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

TABLE I

Peptide	Sequences*
I	A K R A R L S T S F N P V Y P Y E D E S - K ₂₀ = SEQ ID NO:2 + SEQ ID NO:10 + SEQ ID NO:7 + SEQ ID NO:16 - K ₂₀
IC	A K R A R L S T S F N P V Y P Y E D E S - K ₁₀ = SEQ ID NO:2 + SEQ ID NO:10 + SEQ ID NO:7 + SEQ ID NO:16 - K ₁₀
IE	A K R A R L S T S E D E S - K ₁₀ = SEQ ID NO:10 + SEQ ID NO:7 + SEQ ID NO:16 - K ₁₀
ID	A K R A R L S T S F N P V Y P Y E D E S - K ₂₀ = SEQ ID NO:10 + SEQ ID NO:7 + SEQ ID NO:16 - K ₂₀
IA	A K R A R L S T S F N P V Y P Y E D E S = SEQ ID NO:2 + SEQ ID NO:10 + SEQ ID NO:7 + SEQ ID NO:16
LII	A K R A R L S T S F N P V Y P Y E D E S A K R A R L S T S F N P V Y P Y E D E S (for each branch: SEQ ID NO:2 + SEQ ID NO:10 + SEQ ID NO:7 + SEQ ID NO:16)

* in which X₀ = A.

5 The results obtained with these various peptides are illustrated in Table II below.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

CLAIMS

1. Peptide vector for transfecting a chemical substance selected from the group consisting of nucleic acid sequences, proteins, peptides and pharmacologically active chemical substances, characterized in that it contains, in addition to the said chemical substance, at least one transfecting peptide derived from the whole or part of an adenovirus fibre and comprising at least one region consisting of at least 50% of hydrophobic amino acids selected from the group consisting of alanine, valine, phenylalanine, isoleucine, leucine, proline and methionine.
2. Transfection vector according to Claim 1, characterized in that the said transfecting peptide is derived from the whole or part of a fibre of an adenovirus selected from the group consisting of Ad2, Ad3, Ad4, Ad7, Ad8, Ad9, Ad11, Ad12, Ad15, Ad16, Ad21, Ad40, Ad41, FAV1 (CELO) and FAV7.
3. Transfection vector according to Claim 1, characterized in that the said peptide is partially derived from the SV40 virus Vp3 protein.
4. Transfection vector according to any one of Claims 1 to 3, characterized in that the said transfecting peptide comprises at least:
 - a segment of an NLS sequence derived from an adenovirus fibre comprising between 4 and 5 amino acids and including a sequence selected from the group consisting of the following sequences: X_0 -Lys-Arg-Val-Arg (X_0 KRVR) (SEQ ID NO:1), X_0 -Lys-Arg-Ala-Arg (X_0 KRAR) (SEQ ID NO:2), X_0 -Lys-Arg-Ser-Arg (X_0 KRSR) (SEQ ID NO:3), X_0 -Lys-Arg-Leu-Arg (X_0 KRLR) (SEQ ID NO:4), X_0 -Lys-Arg-Thr-Arg (X_0 KRTR) (SEQ ID NO:5), X_0 -Pro-Lys-Lys-Pro-Arg (X_0 PKKPR) (SEQ ID NO:6), in which X_0 is zero or represents Thr (T), Ala (A), Ser-Lys (SK) or Ser (S), or a segment of the SV40 virus Vp3 protein and in particular the sequence GPNKKKRKL (SEQ ID NO:24),

THIS PAGE BLANK (USPTO)

5 - a hydrophobic sequence comprising between 7 and 50 amino acids, derived from an adenovirus fibre and selected from the group consisting of at least one of the following sequences X_1 -Phe-Asn-Pro-Val-Tyr-Pro-Tyr- X_2 (X_1 FNPVYPYX $_2$) (SEQ ID NO:7), X_1 -Phe-Asp-Pro-Val-Tyr-Pro-Tyr- X_2 (X_1 FDPVYPYX $_2$) (SEQ ID NO:8), in which:

10 X_1 is zero or represents a sequence of at most 43 amino acids, preferably a sequence of 5 to 15 amino acids, comprising hydrophobic and/or polar and/or acidic charged amino acids, and in particular one of the following sequences: Leu-Ser-Asp-Ser (LSDS) (SEQ ID NO:9), Leu-Ser-Thr-Ser (LSTS) (SEQ ID NO:10), Leu-Ser-Ser-Ser (LSSS) (SEQ ID NO:11), Pro-Ser-Glu-Asp-Thr (PSEDT) (SEQ ID NO:12), Val-Asp-Asp-Gly (VDDG) (SEQ ID NO:13), Thr-Gln-Tyr-Ala-Glu-Glu-Thr-Glu-Glu-Asn-Asp-Asp (TQYAEETEENDD) (SEQ ID NO:14) or X_2 -Glu-Asp-Asp (X_2 EDD) (SEQ ID NO:15) in which X_2 represents Ala (A), Val (V), Leu (L), Phe (F) or Ile (I) and

20 X_2 is zero or represents a sequence of at most 43 amino acids, preferably a sequence of 5 to 15 amino acids, comprising hydrophobic and/or polar and/or charged amino acids, and in particular one of the following sequences: Glu-Asp-Glu-Ser (EDES) (SEQ ID NO:16), Asp-Thr-Glu-Thr (DTET) (SEQ ID NO:17), Asp-Ala-Asp-Asn (DADN) (SEQ ID NO:18), Asp-Pro-Phe-Asp (DPFD) (SEQ ID NO:19), Gly-Tyr-Ala-Arg (GYAR) (SEQ ID NO:20), Glu-His-Tyr-Asn (EHYN) (SEQ ID NO:21), Asp-Thr-Ser-Ser (DTSS) (SEQ ID NO:22) or Asp-Thr-Phe-Ser (DTFS) (SEQ ID NO:23) and

30 - a polymeric sequence of basic amino acids or a cationic polymeric sequence or a polyalcohol.

5. Transfection vector according to any one of Claims 1 to 3, characterized in that it comprises at least:

35 - a segment of an NLS sequence derived from an adenovirus fibre comprising between 4 and 5 amino acids and including a sequence selected from the group consisting of the following sequences: X_0 -Lys-Arg-Val-

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Arg (X_0 KRVR) (SEQ ID NO:1), X_0 -Lys-Arg-Ala-Arg (X_0 KRAR) (SEQ ID NO:2), X_0 -Lys-Arg-Ser-Arg (X_0 KRSR) (SEQ ID NO:3), X_0 -Lys-Arg-Leu-Arg (X_0 KRLR) (SEQ ID NO:4), X_0 -Lys-Arg-Thr-Arg (X_0 KRTR) (SEQ ID NO:5), X_0 -Pro-Lys-Lys-
5 Pro-Arg (X_0 PKKPR) (SEQ ID NO:6), in which X_0 is zero or represents Thr (T), Ala (A), Ser-Lys (SK) or Ser (S), or a segment of the SV40 virus Vp3 protein and in particular the sequence GPNKKKRKL (SEQ ID NO:24),
- a hydrophobic sequence comprising between 7
10 and 50 amino acids, derived from an adenovirus fibre and selected from the group consisting of at least one of the following sequences X_1 -Phe-Asn-Pro-Val-Tyr-Pro-Tyr- X_2 (X_1 FNPVYPYX $_2$) (SEQ ID NO:7), X_1 -Phe-Asp-Pro-Val-Tyr-Pro-Tyr- X_2 (X_1 FDPVYPYX $_2$) (SEQ ID NO:8), in which:
15 X_1 is zero or represents a sequence of at most 43 amino acids, preferably a sequence of 5 to 15 amino acids, comprising hydrophobic and/or polar and/or acidic charged amino acids, and in particular one of the following sequences: Leu-Ser-Asp-Ser (LSDS) (SEQ ID NO:9), Leu-Ser-Thr-Ser (LSTS) (SEQ ID NO:10), Leu-Ser-Ser-Ser (LSSS) (SEQ ID NO:11), Pro-Ser-Glu-Asp-Thr (PSEDT) (SEQ ID NO:12), Val-Asp-Asp-Gly (VDDG) (SEQ ID NO:13), Thr-Gln-Tyr-Ala-Glu-Glu-Thr-Glu-Glu-Asn-Asp-Asp (TQYAEETEENDD) (SEQ ID NO:14) or X_3 -Glu-Asp-Asp (X_3 EDD)
20 (SEQ ID NO:15) in which X_3 represents Ala (A), Val (V), Leu (L), Phe (F) or Ile (I) and
25 X_2 is zero or represents a sequence of at most 43 amino acids, preferably a sequence of 5 to 15 amino acids, comprising hydrophobic and/or polar and/or charged amino acids, and in particular one of the following sequences: Glu-Asp-Glu-Ser (EDES) (SEQ ID NO:16), Asp-Thr-Glu-Thr (DTET) (SEQ ID NO:17), Asp-Ala-Asp-Asn (DADN) (SEQ ID NO:18), Asp-Pro-Phe-Asp (DPFD) (SEQ ID NO:19), Gly-Tyr-Ala-Arg (GYAR) (SEQ ID NO:20),
30 Glu-His-Tyr-Asn (EHYN) (SEQ ID NO:21), Asp-Thr-Ser-Ser (DTSS) (SEQ ID NO:22) or Asp-Thr-Phe-Ser (DTFS) (SEQ ID NO:23), which transfecting peptide is combined with a

THIS PAGE BLANK (USPTO)

polymeric sequence of basic amino acids, a cationic polymer or a polyalcohol.

6. Transfection vector according to any one of Claims 1 to 5, characterized in that the polymeric sequence of basic amino acids comprises between 10 and 50 amino acid residues, selected from the group consisting of lysine, arginine and ornithine.

7. Transfection vector according to any one of Claims 1 to 6, characterized in that the cationic polymeric sequence is selected from the group consisting of polymeric amines.

8. Transfection vector according to any one of Claims 4 to 7, characterized in that the NLS sequence is at the N-terminal end of the transfecting peptide and the polymeric sequence of basic amino acids is at the C-terminal end of the said transfecting peptide.

9. Transfection vector according to any one of Claims 1 to 8, characterized in that when the chemical substance is a nucleic acid, the transfecting peptide/nucleic acid ratio is between 0.3:1 and 15:1, preferably between 2:1 and 6:1, preferably between 4:1 and 6:1.

10. Transfection vector according to any one of Claims 1 to 9, characterized in that it is combined with a targeting ligand.

11. Pharmaceutical composition, characterized in that it essentially consists of a transfection vector according to any one of Claims 1 to 10 and a suitable vehicle selected from the group consisting of bile salts, antiproteases, cyclodextrins and derivatives thereof, antiseptics and polyols.

12. Method of transfecting eukaryotic cells *in vitro* with a chemical substance selected from the group consisting of nucleic acid sequences, proteins, peptides and pharmacologically active chemical substances, characterized in that it comprises the bringing into contact and the incubation of a transfection vector according to any one of Claims 1 to

THIS PAGE BLANK (USPTO)

8, in a dilution buffer comprising 100-150 mM NaCl with eukaryotic cells for 15 to 120 minutes at room temperature, the chemical substance to be transfected:transfected peptide ratio being between 5 0.3:1 and 15:1, preferably between 2:1 and 6:1, preferably between 4:1 and 6:1.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

- Paramètres intervenant sur l'efficacité de la transfection par le peptide selon l'invention :

Les peptides selon l'invention comprennent essentiellement 3 domaines, le signal de localisation nucléaire, le domaine hydrophobe et le polymère basique.

Pour étudier l'effet de la structure du peptide sur la transfection d'ADN, une série de peptides dans lesquels les différentes parties du peptide I ont été éliminées, dont les séquences sont illustrées au Tableau I ci-après :

TABLEAU I

Peptide	Séquences*
I	A K R A R L S T S F N P V Y P Y E D E S - K ₂₀ = SEQ ID NO:2 + SEQ ID NO:10 + SEQ ID NO:7 + SEQ ID NO:16-K ₂₀
IC	A K R A R L S T S F N P V Y P Y E D E S - K ₁₀ = SEQ ID NO:2 + SEQ ID NO:10 + SEQ ID NO:7 + SEQ ID NO:16-K ₁₀
IE	A K R A R L S T S E D E S - K ₁₀ = SEQ ID NO:2 + SEQ ID NO:10 + SEQ ID NO:16-K ₁₀
ID	L S T S F N P V Y P Y E D E S - K ₂₀ = SEQ ID NO:10 + SEQ ID NO:7 + SEQ ID NO:16-K ₂₀
IA	A K R A R L S T S F N P V Y P Y E D E S = SEQ ID NO:2 + SEQ ID NO:10 + SEQ ID NO:7 + SEQ ID NO:16
LII	A K R A R L S T S F N P V Y P Y E D E S - K A K R A R L S T S F N P V Y P Y E D E S - K (pour chaque branche : SEQ ID NO:2 + SEQ ID NO:10 + SEQ ID NO:7 + SEQ ID NO:16)

* dans lesquelles X₀ = A.

Les résultats obtenus avec ces différents peptides sont illustrés au Tableau II ci-après.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

REVENDICATIONS

1°) Vecteur peptidique de transfection d'une substance chimique sélectionnée dans le groupe constitué par des séquences d'acides nucléiques, des protéines, des peptides et des substances chimiques pharmacologiquement actives, caractérisé en ce qu'il contient outre ladite substance chimique, au moins un peptide de transfection dérivant en tout ou en partie d'une fibre d'un adénovirus sélectionné dans le groupe constitué par Ad2, Ad3, Ad4, Ad7, Ad8, Ad9, Ad11, Ad12, Ad15, Ad16, Ad21, Ad40, Ad41, FAV1 (CELO) et FAV7, lequel peptide de transfection comprend au moins :

10 - un segment d'une séquence NLS dérivée d'une fibre d'adénovirus comprenant entre 4 et 5 aminoacides et incluant une séquence sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences suivantes : X_0 -Lys-Arg-Val-Arg (X_0 KRVR) (SEQ ID NO:1), X_0 -Lys-Arg-Ala-Arg (X_0 KRAR) (SEQ ID NO:2), X_0 -Lys-Arg-Ser-Arg (X_0 KRSR) (SEQ ID NO:3), X_0 -Lys-Arg-Leu-Arg (X_0 KRLR) (SEQ ID NO:4), X_0 -Lys-Arg-Thr-Arg (X_0 KRTR) (SEQ ID NO:5), X_0 -Pro-Lys-Lys-Pro-Arg (X_0 PKKPR) (SEQ ID NO:6), dans lesquelles X_0 est nul ou représente Thr (T), Ala (A), Ser-Lys (SK) ou Ser (S), ou un segment de la protéine Vp3 du virus SV40 et notamment la séquence GPNKKKRKL (SEQ ID NO:24),

20 - une séquence hydrophobe comprenant entre 7 et 50 aminoacides, dérivée d'une fibre d'adénovirus et sélectionnée dans le groupe constitué par au moins l'une des séquences suivantes X_1 -Phe-Asn-Pro-Val-Tyr-Pro-Tyr- X_2 (X_1 FNPVYPY X_2) (SEQ ID NO:7), X_1 -Phe-Asp-Pro-Val-Tyr-Pro-Tyr- X_2 (X_1 FDPVYPY X_2) (SEQ ID NO:8), dans lesquelles :

X_1 est nul ou représente une séquence d'au plus 43 aminoacides, 25 de préférence une séquence de 5 à 15 aminoacides, comprenant des aminoacides hydrophobes et/ou polaires et/ou chargés acides, et notamment l'une des séquences suivantes : Leu-Ser-Asp-Ser (LSDS) (SEQ ID NO:9), Leu-Ser-Thr-Ser

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(LSTS) (SEQ ID NO:10), Leu-Ser-Ser-Ser (LSSS) (SEQ ID NO:11), Pro-Ser-Glu-Asp-Thr (PSEDT) (SEQ ID NO:12), Val-Asp-Asp-Gly (VDDG) (SEQ ID NO:13), Thr-Gln-Tyr-Ala-Glu-Glu-Thr-Glu-Glu-Asn-Asp-Asp (TQYAEETEENDD) (SEQ ID NO:14) ou X_3 -Glu-Asp-Asp (X_3 EDD) (SEQ ID NO:15) dans laquelle X_3 représente

5 sente Ala (A), Val (V), Leu (L), Phe (F) ou Ile (I) et

10 X_2 est nul ou représente une séquence d'au plus 43 aminoacides, de préférence une séquence de 5 à 15 aminoacides, comprenant des aminoacides hydrophobes et/ou polaires et/ou chargés, et notamment l'une des séquences suivantes : Glu-Asp-Glu-Ser (EDES) (SEQ ID NO:16), Asp-Thr-Glu-Thr (DTET) (SEQ ID NO:17), Asp-Ala-Asp-Asn (DADN) (SEQ ID NO:18), Asp-Pro-Phe-Asp (DPFD) (SEQ ID NO:19), Gly-Tyr-Ala-Arg (GYAR) (SEQ ID NO:20), Glu-His-Tyr-Asn (EHYN) (SEQ ID NO:21), Asp-Thr-Ser-Ser (DTSS) (SEQ ID NO:22) ou Asp-Thr-Phe-Ser (DTFS) (SEQ ID NO:23) et

15 - une séquence polymérique d'aminoacides basiques ou une séquence polymérique cationique ou un polyalcool, pour une utilisation comme médicament.

20 2°) Vecteur peptidique de transfection d'une substance chimique sélectionnée dans le groupe constitué par des séquences d'acides nucléiques, des protéines, des peptides et des substances chimiques pharmacologiquement actives, caractérisé en ce qu'il contient outre ladite substance chimique, au moins un peptide de transfection dérivant en tout ou en partie d'une fibre d'un adénovirus sélectionné dans le groupe constitué par Ad2, Ad3, Ad4, Ad7, Ad8, Ad9, Ad11, Ad12, Ad15, Ad16, Ad21, Ad40, Ad41, FAV1 (CELO) et FAV7, lequel peptide de transfection comprend au moins :

25 - un segment d'une séquence NLS dérivée d'une fibre d'adénovirus comprenant entre 4 et 5 aminoacides et incluant une séquence sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences suivantes : X_0 -Lys-Arg-

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Val-Arg (X_0 KRVR) (SEQ ID NO:1), X_0 -Lys-Arg-Ala-Arg (X_0 KRAR) (SEQ ID NO:2), X_0 -Lys-Arg-Ser-Arg (X_0 KRSR) (SEQ ID NO:3), X_0 -Lys-Arg-Leu-Arg (X_0 -KRLR) (SEQ ID NO:4), X_0 -Lys-Arg-Thr-Arg (X_0 KRTR) (SEQ ID NO:5), X_0 -Pro-Lys-Lys-Pro-Arg (X_0 PKKPR) (SEQ ID NO:6), dans lesquelles X_0 est nul ou représenté 5 Thr (T), Ala (A), Ser-Lys (SK) ou Ser (S), ou un segment de la protéine Vp3 du virus SV40 et notamment la séquence GPNKKKRKL (SEQ ID NO:24),

- une séquence hydrophobe comprenant entre 7 et 50 aminoacides, dérivée d'une fibre d'adénovirus et sélectionnée dans le groupe constitué par au moins l'une des séquences suivantes X_1 -Phe-Asn-Pro-Val-Tyr-Pro-Tyr- X_2 10 (X_1 FNPVYPY X_2) (SEQ ID NO:7), X_1 -Phe-Asp-Pro-Val-Tyr-Pro-Tyr- X_2 (X_1 FDPVYPY X_2) (SEQ ID NO:8), dans lesquelles :

X_1 est nul ou représente une séquence d'au plus 43 aminoacides, de préférence une séquence de 5 à 15 aminoacides, comprenant des aminoacides hydrophobes et/ou polaires et/ou chargés acides, et notamment l'une des 15 séquences suivantes : Leu-Ser-Asp-Ser (LSDS) (SEQ ID NO:9), Leu-Ser-Thr-Ser (LSTS) (SEQ ID NO:10), Leu-Ser-Ser-Ser (LSSS) (SEQ ID NO:11), Pro-Ser-Glu-Asp-Thr (PSEDT) (SEQ ID NO:12), Val-Asp-Asp-Gly (VDDG) (SEQ ID NO:13), Thr-Gln-Tyr-Ala-Glu-Glu-Thr-Glu-Glu-Asn-Asp-Asp (TQYAEETEENDD) (SEQ ID NO:14) ou X_3 -Glu-Asp-Asp (X_3 EDD) (SEQ ID NO:15) dans laquelle X_3 représente 20 Ala (A), Val (V), Leu (L), Phe (F) ou Ile (I) et

X_2 est nul ou représente une séquence d'au plus 43 aminoacides, de préférence une séquence de 5 à 15 aminoacides, comprenant des aminoacides hydrophobes et/ou polaires et/ou chargés, et notamment l'une des séquences suivantes : Glu-Asp-Glu-Ser (EDES) (SEQ ID NO:16), Asp-Thr-Glu-Thr (DTET) 25 (SEQ ID NO:17), Asp-Ala-Asp-Asn (DADN) (SEQ ID NO:18), Asp-Pro-Phe-Asp (DPFD) (SEQ ID NO:19), Gly-Tyr-Ala-Arg (GYAR) (SEQ ID NO:20), Glu-His-Tyr-Asn (EHYN) (SEQ ID NO:21), Asp-Thr-Ser-Ser (DTSS) (SEQ ID NO:22) ou Asp-

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Thr-Phe-Ser (DTFS) (SEQ ID NO:23), lequel peptide de transfection est associé à une séquence polymérique d'aminoacides basiques, à un polymère cationique ou à un polyalcool,
pour une utilisation comme médicament.

5 3°) Vecteur de transfection selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce que la séquence polymérique d'aminoacides basiques comprend entre 10 et 50 résidus d'aminoacides, sélectionnés dans le groupe constitué par la lysine, l'arginine et l'ornithine.

10 4°) Vecteur de transfection selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la séquence polymérique cationique est sélectionnée dans le groupe constitué par les amines polymériques.

15 5°) Vecteur de transfection selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la séquence NLS est à l'extrémité N-terminale du peptide de transfection et la séquence polymérique d'aminoacides basiques est à l'extrémité C-terminale dudit peptide de transfection.

6°) Vecteur de transfection selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que lorsque la substance chimique est un acide nucléique, le rapport peptide de transfection/acide nucléique est compris entre 0,3:1 et 15:1, de manière préférée entre 2:1 et 6:1, de préférence entre 4:1 et 6:1.

20 7°) Vecteur de transfection selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il est associé à un ligand de ciblage.

25 8°) Composition, caractérisée en ce qu'elle est essentiellement constituée par un vecteur de transfection selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 et un véhicule convenable sélectionné dans le groupe constitué par les sels biliaires, les antiprotéases, les cyclodextrines et leurs dérivés, les antiseptiques et les polyols, pour une utilisation comme médicament.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

9°) Procédé de transfection *in vitro* de cellules eucaryotes avec une substance chimique sélectionnée dans le groupe constitué par des séquences d'acides nucléiques, des protéines, des peptides et des substances chimiques pharmacologiquement actives, caractérisé en ce qu'il comprend la mise en 5 contact et l'incubation d'un vecteur de transfection selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, dans un tampon de dilution comprenant du NaCl 100-150 mM avec des cellules eucaryotes pendant 15 à 120 minutes à température ambiante, le rapport substance chimique à transfacter sur peptide de transfection étant compris entre 0,3:1 et 15:1, de manière préférée entre 2:1 et 6:1, de préférence entre 4:1 et 6:1.

10 10°) Vecteur peptidique de transfection d'une substance chimique sélectionnée dans le groupe constitué par des séquences d'acides nucléiques, des protéines, des peptides et des substances chimiques pharmacologiquement actives, caractérisé en ce qu'il contient outre ladite substance 15 chimique, au moins un peptide de transfection qui comprend :

- un segment d'une séquence NLS constitué par la séquence ID NO:2,
- un segment d'une séquence constitué par la séquence ID NO:10,
- un segment d'une séquence constitué par la séquence ID NO:16,

20 et

- une polylysine,

pour une utilisation comme médicament.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

09/530560

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire BL0cp263/34P	POUR SUITE voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après A DONNER	
Demande internationale n° PCT/FR 98/ 02344	Date du dépôt international (jour/mois/année) 03/11/1998	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) 03/11/1997
Déposant COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE et al.		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 5 feuilles.

Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. **Base du rapport**

a. En ce qui concerne la **langue**, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.

la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.

b. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :

contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.

déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.

remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.

remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.

La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne vas pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.

La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.

2. Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).

3. Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).

4. En ce qui concerne le titre,

le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.

Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

5. En ce qui concerne l'abrégué,

le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant

le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

6. La figure des dessins à publier avec l'abrégué est la Figure n°

suggérée par le déposant.

parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.

parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

7

Aucune des figures n'est à publier.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR 98/02344

Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. Les revendications n°s se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
voir feuille supplémentaire SUITE DES RENSEIGNEMENTS PCT/ISA/210
2. Les revendications n°s se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
3. Les revendications n°s sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°s
4. Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°s

Remarque quant à la réserve

Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.

Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

Eu égard à l'étendue extrême des revendications du type Markush, la recherche internationale a été effectuée en tenant dûment compte des Directives concernant la recherche selon le PCT (PCT/GL/2), C-III, paragraphe 2.1, 2.3 en combinaison avec 3.7 et de la règle 33.3 PCT, une attention particulière étant portée au concept inventif tel qu'illustre par les peptides du tableau 1 et l'usage d'un peptide de transfection dérivant en tout ou en partie de la fibre d'adénovirus comme vecteur de transfection. La recherche internationale peut être considérée comme complète dans la mesure du possible et raisonnable dans ce sens qu'elle a englobé l'objet des revendications dans son intégralité.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

FR 98/02344

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 C12N15/87 C12N15/62 C07K14/025 C07K14/075 A61K47/48
A61K48/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N C07K A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	FENDER P ET AL: "Adenovirus dodecahedron, a new vector for human gene transfer" NATURE BIOTECHNOLOGY., vol. 15, janvier 1997, pages 52-56, XP002071995 voir le document en entier, et particulièrement page 53, colonne 2, ligne 9 - ligne 11 --- WO 97 18317 A (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE ;CENTRE NAT RECH SCIENT (FR); CHROBO) 22 mai 1997 cité dans la demande voir page 22, ligne 10 --- -/-	1,2,4-9, 11,12
X		1,2,4-9, 11,12

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

18 mars 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

01/04/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Lonnoy, O

THIS PAGE BLANK (USPTO)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

FR 98/02344

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 94 17832 A (SCRIPPS RESEARCH INST ; NEMEROW GLEN R (US); WICKHAM THOMAS J (US)) 18 août 1994 voir page 80, ligne 30 - ligne 34; figure 3 ---	
A	WO 97 20575 A (UNIV ALABAMA AT BIRMINGHAM RES) 12 juin 1997 ---	
A	HONG J S ET AL: "THE AMINO TERMINUS OF THE ADENOVIRUS FIBER PROTEIN ENCODES THE NUCLEAR LOCALIZATION SIGNAL" VIROLOGY, vol. 18, no. 2, décembre 1991, pages 758-767, XP000607409 ---	
A	CLEVER J ET AL: "Simian virus 40 Vp2/3 small structural proteins harbor their own nuclear transport signal" VIROLOGY, vol. 181, no. 1, mars 1991, pages 78-90, XP002097033 voir abrégé -----	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

[REDACTED] /FR 98/02344

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
WO 9718317	A	22-05-1997		FR 2741087 A		16-05-1997
				FR 2747681 A		24-10-1997
				EP 0861329 A		02-09-1998
WO 9417832	A	18-08-1994		AU 6133394 A		29-08-1994
WO 9720575	A	12-06-1997		AU 1282297 A		27-06-1997
				CA 2237059 A		12-06-1997
				EP 0866721 A		30-09-1998

THIS PAGE BLANK (USPTO)

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION D'ELECTION
(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

United States Patent and Trademark
Office
(Box PCT)
Crystal Plaza 2
Washington, DC 20231
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 10 juillet 1999 (10.07.99)	Destinataire: United States Patent and Trademark Office (Box PCT) Crystal Plaza 2 Washington, DC 20231 ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE
Demande internationale no PCT/FR98/02344	Référence du dossier du déposant ou du mandataire BLOcp263/34P
Date du dépôt international (jour/mois/année) 03 novembre 1998 (03.11.98)	Date de priorité (jour/mois/année) 03 novembre 1997 (03.11.97)
Déposant CHROBOCZEK, Jadwiga etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:

dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

25 mai 1999 (25.05.99)

dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection a été faite n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télécopieur: (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé D. Barmes no de téléphone: (41-22) 338.83.38
--	---

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference BLOcp263/34P	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR98/02344	International filing date (day/month/year) 03 November 1998 (03.11.98)	Priority date (day/month/year) 03 November 1997 (03.11.97)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/87		
Applicant COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 6 sheets, including this cover sheet.

This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 6 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I Basis of the report
- II Priority
- III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV Lack of unity of invention
- V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI Certain documents cited
- VII Certain defects in the international application
- VIII Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 25 May 1999 (25.05.99)	Date of completion of this report 08 February 2000 (08.02.2000)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR98/02344

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

 the international application as originally filed. the description, pages 1-16, 18-24, as originally filed,
pages _____, filed with the demand,
pages 17, filed with the letter of 10 January 2000 (10.01.2000),
pages _____, filed with the letter of _____ the claims, Nos. _____, as originally filed,
Nos. _____, as amended under Article 19,
Nos. _____, filed with the demand,
Nos. 1-10, filed with the letter of 10 January 2000 (10.01.2000),
Nos. _____, filed with the letter of _____ the drawings, sheets/fig 1/7-7/7, as originally filed,
sheets/fig _____, filed with the demand,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

 the description, pages _____ the claims, Nos. _____ the drawings, sheets/fig _____

3. This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/FR 98/02344

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-10	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-10	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-10	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

1. The following document is referred to herein:

D1: WO 97/18317

2. D1 describes a peptide vector for transfecting a chemical substance, consisting of an adenoviral protein complex bound to said chemical substance by a peptide derived from the fibre of adenovirus Ad3. The peptide comprises 20 amino acids corresponding to the N-terminal portion of the Ad3 fibre in association with 20 lysines on the C-terminal side. The transfection peptide sequence is an exact match for the sequence of peptide I of the present application. Therefore, its N-terminal portion includes, in particular, a segment of an NLS sequence and a hydrophobic sequence. The polylysine enables attachment of the chemical substance, particularly a nucleic acid, via an ionic bond, and gives a polycation which can thus bind polyanions such as DNA. A polyarginine may also be used instead of a polylysine as the ligand (page 6, lines 14-32; page 22, lines 7-10). In D1, the ratio of the transfection peptide to the nucleic acid is 3.33:1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(5 µg of peptide, 1.5 µg of plasmid) (page 23, lines 12 and 13). D1 also mentions a pharmaceutical composition containing, in addition to the transfection peptide, at least one pharmaceutically acceptable carrier such as dextrose, glycerol or benzyl alcohol (page 8, lines 1-8).

The subject matter of claims 1, 2 and 10 particularly relates to a peptide vector for transfecting a chemical substance, including said chemical substance and at least one peptide derived from an adenovirus fibre and including at least one segment of an NLS sequence, a hydrophobic sequence and a polymeric basic amino acid sequence, for use as a drug. On the basis of the wording of claims 1, 2 and 10, the transfecting peptide vector claimed may also contain, in addition to the chemical substance and the peptide derived from an adenovirus fibre, an adenoviral protein complex as described in D1. Furthermore, because of the expression "includes at least", the peptide is not restricted to the sequences cited but may also contain additional sequences. In this context, it should be noted that the sequences preceded by the word "particularly" have been included by way of example and are in no way exhaustive, meaning that they cannot be considered to have a limiting effect on the subject matter of the claims in question. Therefore, the transfecting peptide vector *per se*, as defined in claims 1-3 and 5-10, is not novel over D1. However, D1 does not specifically describe the use of the transfection vector as a drug. It follows that claims 1-10 may be considered to be novel. Nevertheless, D1 does mention the use of the transfection vector described therein in a

THIS PAGE BLANK (USPTO)

pharmaceutical composition. D1 also indicates the various possible uses as well as the potential uses as drugs (page 8, line 15 to page 9, line 8). Therefore, a person skilled in the art aware of D1 could arrive at the subject matter of claims 1-3 and 5-10 on the basis of his or her general knowledge and without having to take an inventive step. It follows that claims 1-3 and 5-10 are not inventive and thus fail to comply with the requirements of PCT Article 33(3).

3. The subject matter of claim 4 differs from D1 in that the transfection peptide claimed is associated with a cationic polymer selected from polymeric amines. As lysine is a cationic amino acid, the transfection peptide described in D1 is associated with a cationic polymer. Since the bond between the polycation (polylysine) and the polyanion (the chemical substance, e.g. DNA) is ionic, the use of another type of known cationic polymer, e.g. a polymeric amine, is merely an obvious alternative. Therefore, a person skilled in the art would not need to take an inventive step to arrive at the subject matter of claim 4. It follows that claim 4 fails to comply with the requirements of PCT Article 33(3).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1. Claims 1-10 are not supported by the description since the present application merely contains a vague statement relating to the use of the transfecting peptide vector claimed as a drug (page 12, lines 10 and 11), and no technical feature as required by PCT Article 6 (see also the PCT Guidelines, III, 6.3).
2. Claims 1 and 2 are not supported by the description. The subject matter of these claims relates to a transfection vector optionally containing a segment of protein Vp3. The description contains no information on this protein. Therefore, contrary to the requirement of PCT Article 6, claims 1 and 2 are not supported by the description.
3. The expression "at least" in claims 1, 2 and 10 is vague and undefined. It does not refer to a technical feature and is open to interpretation. Therefore, claims 1, 2 and 10 fail to comply with the requirements of PCT Article 6.
4. In claims 1, 2 and 10, the phrase "which transfection peptide includes ..." does not clearly define the desired scope of protection. Therefore, the word "includes" should be replaced with "consists of" (PCT Article 6).
5. The expression "at least partially derived" used in claims 1 and 2 is vague and undefined. It does not refer to a technical feature and is open to

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VIII. Certain observations on the international application

interpretation. Indeed, a peptide may be derived from another peptide or from a protein, meaning that the resulting product is completely different, structurally and functionally, from the starting product (PCT Article 6).

6. Claims 1 and 2 lack clarity as a result of the expression "a segment of the protein". This expression is not suitable for defining the scope of protection claimed because, in the absence of additional indications, it is so vague and broad that it even covers a single amino acid (PCT Article 6).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

REC'D 14 FEB 2000

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire BLOcp263/34P	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR98/02344	Date du dépôt international (jour/mois/année) 03/11/1998	Date de priorité (jour/mois/année) 03/11/1997
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C12N15/87		
Déposant COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE et al.		
<p>1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.</p> <p>2. Ce RAPPORT comprend 6 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).</p> <p>Ces annexes comprennent 6 feuilles.</p>		
<p>3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:</p> <ul style="list-style-type: none"> I <input checked="" type="checkbox"/> Base du rapport II <input type="checkbox"/> Priorité III <input type="checkbox"/> Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle IV <input type="checkbox"/> Absence d'unité de l'invention V <input checked="" type="checkbox"/> Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration VI <input type="checkbox"/> Certains documents cités VII <input type="checkbox"/> Irrégularités dans la demande internationale VIII <input checked="" type="checkbox"/> Observations relatives à la demande internationale 		

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 25/05/1999	Date d'achèvement du présent rapport 08.02.00
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international: Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Chavanne, F N° de téléphone +49 89 2399 8399



THIS PAGE BLANK (USPTO)

**RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR98/02344

I. Base du rapport

1. Ce rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées, dans le présent rapport, comme "initiallement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications.*) :

Description, pages:

1-16,18-24	version initiale
17	reçue(s) avec télécopie du 10/01/2000

Revendications, N°:

1-10	reçue(s) avec télécopie du 10/01/2000
------	---------------------------------------

Dessins, feuilles:

1/7-7/7	version initiale
---------	------------------

2. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- de la description, pages :
- des revendications, n°s :
- des dessins, feuilles :

3. Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

4. Observations complémentaires, le cas échéant :

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR98/02344

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 1-10
	Non : Revendications
Activité inventive	Oui : Revendications
	Non : Revendications 1-10
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-10
	Non : Revendications

2. Citations et explications

voir feuille séparée

VIII. Observations relatives à la demande internationale

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :

voir feuille séparée

THIS PAGE BLANK (USPTO)

V. Déclaration motivée selon la règle 66.2(a)(ii) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Il est fait référence aux document suivant:

D1: WO 97/18317

2. D1 décrit un vecteur peptidique de transfection d'une substance chimique constitué d'un complexe protéique adénoviral lié à ladite substance chimique par un peptide dérivant de la fibre de l'adénovirus Ad3. Ce peptide comporte 20 acides aminés correspondant à la partie N-terminale de la fibre Ad3 associés à 20 lysines du côté C-terminal. La séquence de ce peptide de transfection correspond exactement à la séquence du peptide I de la présente demande. Sa partie N-terminale comprend donc notamment un segment d'une séquence NLS et une séquence hydrophobe. La polylysine permet l'attachement de la substance chimique, notamment un acide nucléique, par liaison de type ionique, la polylysine donnant un polycation pouvant donc fixer des polyanions comme l'ADN. Au lieu d'une polylysine, une polyarginine peut également être utilisée comme ligand (page 6, lignes 14 à 32; page 22, lignes 7 à 10). Dans D1, le rapport peptide de transfection/acide nucléique est de 3,33:1 (5 µg de peptide, 1,5 µg de plasmide) (page 23, lignes 12 et 13). D1 mentionne également une composition pharmaceutique comprenant en outre du peptide de transfection au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable tel, par exemple, le dextrose, le glycérol ou l'alcool benzylique (page 8, lignes 1-8).
L'objet des revendications 1, 2 et 10 correspond notamment à un vecteur peptide de transfection d'une substance chimique comprenant ladite substance chimique et au moins un peptide dérivant d'une fibre d'adénovirus et comprenant au moins un segment d'une séquence NLS, une séquence hydrophobe et une séquence polymérique d'acides aminés basiques, pour une utilisation comme médicament. De part la formulation des revendications 1, 2 et 10, le vecteur peptidique de transfection revendiqué peut également, en plus de la substance chimique et du peptide dérivé d'une fibre d'adénovirus, contenir un complexe protéique adénoviral tel que décrit dans D1. De plus, le peptide, de par l'expression "comprend au moins" ne se limite pas aux séquences citées mais peut également

THIS PAGE BLANK (USPTO)

contenir des séquences supplémentaires. Dans ce contexte, il est à noter que les séquences introduites par l'expression "notamment" sont introduites à titre d'exemple indicatif et en aucun cas exhaustif, et ne peuvent donc être considérées comme limitant l'objet des revendications concernées. Donc, au vu de D1, le vecteur peptidique de transfection per se tel que défini dans les revendications 1-3 et 5-10 n'est pas nouveau. En revanche, D1 ne décrit pas de manière spécifique l'utilisation du vecteur de transfection comme médicament. Par conséquent, les revendications 1-10 peuvent être considérées comme nouvelles.

En revanche, D1 mentionne l'utilisation dans une composition pharmaceutique du vecteur de transfection qu'il décrit. D1 indique également les différentes formes d'application possible ainsi que les applications potentielles comme médicaments (page 8, ligne 15 à page 9, ligne 8). Par conséquent, au vu de D1, l'homme du métier par la simple application de ses connaissances et sans la mise en d'oeuvre d'aucune activité inventive parviendrait à l'objet des revendications 1-3 et 5-10. Ces revendications ne sont donc pas inventives. Les revendications 1-3 et 5-10 ne remplissent donc pas les conditions de l'Article 33(3) PCT.

3. L'objet de la revendication 4 se différencie de D1 en ce que le peptide de transfection revendiqué est associé à un polymère cationique sélectionné parmi les amines polymériques. La lysine étant un acide aminé cationique, le peptide de transfection décrit dans D1 est associé à un polymère cationique. La liaison établie entre le polycation (la polylysine) et le polyanion (la substance chimique, par exemple l'ADN) étant de type ionique, l'utilisation d'un autre type de polymère cationique connu, comme par exemple une amine polymérique, ne constitue qu'une alternative évidente. Par conséquent, l'Homme du métier n'aurait besoin de mettre en oeuvre aucune activité inventive pour parvenir à l'objet de la revendication 4. Par conséquent, la revendication 4 ne remplit pas les conditions de l'Article 33(3) PCT.

VIII. Observations relatives à la demande internationale

1. Les revendications 1-10 ne sont pas fondées sur la description car la présente application ne contient qu'une vague déclaration quant à l'utilisation comme

THIS PAGE BLANK (USPTO)

médicament du vecteur peptidique de transfection revendiqué (page 12, lignes 10 et 11) et aucune caractéristique technique comme requis à l'Article 6 PCT (voir également Directives III-6.3 PCT).

2. Les revendications 1 et 2 ne sont pas fondées sur la description. Leur objet est un vecteur de transfection pouvant contenir un segment de la protéine Vp3. La description ne contient aucune information sur cette protéine. De ce fait, les revendications 1 et 2 ne se fondent pas sur la description comme requis à l'Article 6 PCT.
3. L'expression "au moins" des revendications 1, 2 et 10 est vague et non définie. Elle ne se réfère à aucune caractéristique technique et peut être sujette à interprétation. Par conséquent, les revendications 1,2 et 10 ne remplissent pas les conditions de l'Article 6 PCT.
4. Dans les revendications 1,2 et 10, la formulation "lequel peptide de transfection comprend..." ne défini pas clairement l'étendue de la protection recherchée. Par conséquent, l'expression "comprend" devrait être remplacée par "consiste en" (Art. 6 PCT).
5. L'expression "dérivant en tout ou en partie" des revendications 1, 2, est vague et non définie. Elle ne se réfère à aucune caractéristique technique et peut être sujette à interprétation. En effet, un peptide peut dériver d'un autre peptide ou d'une protéine de telle manière que le produit résultant soit complètement différent de par sa structure et ses fonctions du produit de départ (Art. 6 PCT).
6. Les revendications 1 et 2 manquent de clarté dû à l'expression "un segment de la protéine". Cette expression n'est pas adaptée pour définir l'étendue de la protection revendiquée, du fait que, sans indications supplémentaires, ce concept est tellement vague et étendu qu'il englobe même un unique acide aminé (Art. 6 PCT).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

- Paramètres intervenant sur l'efficacité de la transfection par le peptide selon l'invention :

Les peptides selon l'invention comprennent essentiellement 3 domaines, le signal de localisation nucléaire, le domaine hydrophobe et le polymère basique.

Pour étudier l'effet de la structure du peptide sur la transfection d'ADN, une série de peptides dans lesquels les différentes parties du peptide I ont été éliminées, dont les séquences sont illustrées au Tableau I ci-après :

TABLEAU I

Peptide	Séquences*
I	A K R A R L S T S F N P V Y P Y E D E S - K₂₀ = SEQ ID NO:2 + SEQ ID NO:10 + SEQ ID NO:7 + SEQ ID NO:16-K ₂₀
IC	A K R A R L S T S F N P V Y P Y E D E S - K₁₀ = SEQ ID NO:2 + SEQ ID NO:10 + SEQ ID NO:7 + SEQ ID NO:16-K ₁₀
IE	A K R A R L S T S E D E S - K₁₀ = SEQ ID NO:2 + SEQ ID NO:10 + SEQ ID NO:16-K ₁₀
ID	L S T S F N P V Y P Y E D E S - K₂₀ = SEQ ID NO:10 + SEQ ID NO:7 + SEQ ID NO:16-K ₂₀
IA	A K R A R L S T S F N P V Y P Y E D E S = SEQ ID NO:2 + SEQ ID NO:10 + SEQ ID NO:7 + SEQ ID NO:16
LII	A K R A R L S T S F N P V Y P Y E D E S - K A K R A R L S T S F N P V Y P Y E D E S - K  (pour chaque branche : SEQ ID NO:2 + SEQ ID NO:10 + SEQ ID NO:7 + SEQ ID NO:16)

* dans lesquelles X₀ = A.

Les résultats obtenus avec ces différents peptides sont illustrés au Tableau II ci-après.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

REVENDICATIONS

1°) Vecteur peptidique de transfection d'une substance chimique sélectionnée dans le groupe constitué par des séquences d'acides nucléiques, des protéines, des peptides et des substances chimiques pharmacologiquement actives, caractérisé en ce qu'il contient outre ladite substance chimique, au moins un peptide de transfection dérivant en tout ou en partie d'une fibre d'un adénovirus sélectionné dans le groupe constitué par Ad2, Ad3, Ad4, Ad7, Ad8, Ad9, Ad11, Ad12, Ad15, Ad16, Ad21, Ad40, Ad41, FAV1 (CELO) et FAV7, lequel peptide de transfection comprend au moins :

10 - un segment d'une séquence NLS dérivée d'une fibre d'adénovirus comprenant entre 4 et 5 aminoacides et incluant une séquence sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences suivantes : X_0 -Lys-Arg-Val-Arg (X_0 KRVR) (SEQ ID NO:1), X_0 -Lys-Arg-Ala-Arg (X_0 KRAR) (SEQ ID NO:2), X_0 -Lys-Arg-Ser-Arg (X_0 KRSR) (SEQ ID NO:3), X_0 -Lys-Arg-Leu-Arg 15 (X_0 KRLR) (SEQ ID NO:4), X_0 -Lys-Arg-Thr-Arg (X_0 KRTR) (SEQ ID NO:5), X_0 -Pro-Lys-Lys-Pro-Arg (X_0 PKKPR) (SEQ ID NO:6), dans lesquelles X_0 est nul ou représente Thr (T), Ala (A), Ser-Lys (SK) ou Ser (S), ou un segment de la protéine Vp3 du virus SV40 et notamment la séquence GPNKKKRKL (SEQ ID NO:24),

20 - une séquence hydrophobe comprenant entre 7 et 50 aminoacides, dérivée d'une fibre d'adénovirus et sélectionnée dans le groupe constitué par au moins l'une des séquences suivantes X_1 -Phe-Asn-Pro-Val-Tyr-Pro-Tyr- X_2 (X_1 FNPVYPY X_2) (SEQ ID NO:7), X_1 -Phe-Asp-Pro-Val-Tyr-Pro-Tyr- X_2 25 (X_1 FDPVYPY X_2) (SEQ ID NO:8), dans lesquelles :

X_1 est nul ou représente une séquence d'au plus 43 aminoacides, de préférence une séquence de 5 à 15 aminoacides, comprenant des aminoacides hydrophobes et/ou polaires et/ou chargés acides, et notamment l'une des séquences suivantes : Leu-Ser-Asp-Ser (LSDS) (SEQ ID NO:9), Leu-Ser-Thr-Ser

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(LSTS) (SEQ ID NO:10), Leu-Ser-Ser-Ser (LSSS) (SEQ ID NO:11), Pro-Ser-Glu-Asp-Thr (PSEDT) (SEQ ID NO:12), Val-Asp-Asp-Gly (VDDG) (SEQ ID NO:13), Thr-Gln-Tyr-Ala-Glu-Glu-Thr-Glu-Glu-Asn-Asp-Asp (TQYAEETEENDD) (SEQ ID NO:14) ou X_3 -Glu-Asp-Asp (X_3 EDD) (SEQ ID NO:15) dans laquelle X_3 représente Ala (A), Val (V), Leu (L), Phe (F) ou Ile (I) et

10 X_2 est nul ou représente une séquence d'au plus 43 aminoacides, de préférence une séquence de 5 à 15 aminoacides, comprenant des aminoacides hydrophobes et/ou polaires et/ou chargés, et notamment l'une des séquences suivantes : Glu-Asp-Glu-Ser (EDES) (SEQ ID NO:16), Asp-Thr-Glu-Thr (DTET) (SEQ ID NO:17), Asp-Ala-Asp-Asn (DADN) (SEQ ID NO:18), Asp-Pro-Phe-Asp (DPFD) (SEQ ID NO:19), Gly-Tyr-Ala-Arg (GYAR) (SEQ ID NO:20), Glu-His-Tyr-Asn (EHYN) (SEQ ID NO:21), Asp-Thr-Ser-Ser (DTSS) (SEQ ID NO:22) ou Asp-Thr-Phe-Ser (DTFS) (SEQ ID NO:23) et

15 - une séquence polymérique d'aminoacides basiques ou une séquence polymérique cationique ou un polyalcool, pour une utilisation comme médicament.

20 2°) Vecteur peptidique de transfection d'une substance chimique sélectionnée dans le groupe constitué par des séquences d'acides nucléiques, des protéines, des peptides et des substances chimiques pharmacologiquement actives, caractérisé en ce qu'il contient outre ladite substance chimique, au moins un peptide de transfection dérivant en tout ou en partie d'une fibre d'un adénovirus sélectionné dans le groupe constitué par Ad2, Ad3, Ad4, Ad7, Ad8, Ad9, Ad11, Ad12, Ad15, Ad16, Ad21, Ad40, Ad41, FAV1 (CELO) et FAV7, lequel peptide de transfection comprend au moins :

25 - un segment d'une séquence NLS dérivée d'une fibre d'adénovirus comprenant entre 4 et 5 aminoacides et incluant une séquence sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences suivantes : X_0 -Lys-Arg-

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Val-Arg (X_0 KRVR) (SEQ ID NO:1), X_0 -Lys-Arg-Ala-Arg (X_0 KRAR) (SEQ ID NO:2), X_0 -Lys-Arg-Ser-Arg (X_0 KRSR) (SEQ ID NO:3), X_0 -Lys-Arg-Leu-Arg (X_0 -KRLR) (SEQ ID NO:4), X_0 -Lys-Arg-Thr-Arg (X_0 KRTR) (SEQ ID NO:5), X_0 -Pro-Lys-Lys-Pro-Arg (X_0 PKKPR) (SEQ ID NO:6), dans lesquelles X_0 est nul ou représente Thr (T), Ala (A), Ser-Lys (SK) ou Ser (S), ou un segment de la protéine Vp3 du virus SV40 et notamment la séquence GPNKKKRKL (SEQ ID NO:24),

5 - une séquence hydrophobe comprenant entre 7 et 50 aminoacides, dérivée d'une fibre d'adénovirus et sélectionnée dans le groupe constitué par au moins l'une des séquences suivantes X_1 -Phe-Asn-Pro-Val-Tyr-Pro-Tyr- X_2 (10 X_1 FNPVYPY X_2) (SEQ ID NO:7), X_1 -Phe-Asp-Pro-Val-Tyr-Pro-Tyr- X_2 (X_1 FDPVYPY X_2) (SEQ ID NO:8), dans lesquelles :

15 X_1 est nul ou représente une séquence d'au plus 43 aminoacides, de préférence une séquence de 5 à 15 aminoacides, comprenant des aminoacides hydrophobes et/ou polaires et/ou chargés acides, et notamment l'une des séquences suivantes : Leu-Ser-Asp-Ser (LSDS) (SEQ ID NO:9), Leu-Ser-Thr-Ser (LSTS) (SEQ ID NO:10), Leu-Ser-Ser-Ser (LSSS) (SEQ ID NO:11), Pro-Ser-Glu-Asp-Thr (PSEDT) (SEQ ID NO:12), Val-Asp-Asp-Gly (VDDG) (SEQ ID NO:13), Thr-Gln-Tyr-Ala-Glu-Glu-Thr-Glu-Glu-Asn-Asp-Asp (TQYAEETEENDD) (SEQ ID NO:14) ou X_3 -Glu-Asp-Asp (X_3 EDD) (SEQ ID NO:15) dans laquelle X_3 représente Ala (A), Val (V), Leu (L), Phe (F) ou Ile (I) et

20 X_2 est nul ou représente une séquence d'au plus 43 aminoacides, de préférence une séquence de 5 à 15 aminoacides, comprenant des aminoacides hydrophobes et/ou polaires et/ou chargés, et notamment l'une des séquences suivantes : Glu-Asp-Glu-Ser (EDES) (SEQ ID NO:16), Asp-Thr-Glu-Thr (DTET) (SEQ ID NO:17), Asp-Ala-Asp-Asn (DADN) (SEQ ID NO:18), Asp-Pro-Phe-Asp (DPFD) (SEQ ID NO:19), Gly-Tyr-Ala-Arg (GYAR) (SEQ ID NO:20), Glu-His-Tyr-Asn (EHYN) (SEQ ID NO:21), Asp-Thr-Ser-Ser (DTSS) (SEQ ID NO:22) ou Asp-

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Thr-Phe-Ser (DTFS) (SEQ ID NO:23), lequel peptide de transfection est associé à une séquence polymérique d'aminoacides basiques, à un polymère cationique ou à un polyalcool,
pour une utilisation comme médicament.

5 3°) Vecteur de transfection selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce que la séquence polymérique d'aminoacides basiques comprend entre 10 et 50 résidus d'aminoacides, sélectionnés dans le groupe constitué par la lysine, l'arginine et l'ornithine.

10 4°) Vecteur de transfection selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la séquence polymérique cationique est sélectionnée dans le groupe constitué par les amines polymériques.

15 5°) Vecteur de transfection selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la séquence NLS est à l'extrémité N-terminale du peptide de transfection et la séquence polymérique d'aminoacides basiques est à l'extrémité C-terminale dudit peptide de transfection.

6°) Vecteur de transfection selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que lorsque la substance chimique est un acide nucléique, le rapport peptide de transfection/acide nucléique est compris entre 0,3:1 et 15:1, de manière préférée entre 2:1 et 6:1, de préférence entre 4:1 et 6:1.

20 7°) Vecteur de transfection selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il est associé à un ligand de ciblage.

25 8°) Composition, caractérisée en ce qu'elle est essentiellement constituée par un vecteur de transfection selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 et un véhicule convenable sélectionné dans le groupe constitué par les sels biliaires, les antiprotéases, les cyclodextrines et leurs dérivés, les antiseptiques et les polyols, pour une utilisation comme médicament.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

9°) Procédé de transfection *in vitro* de cellules eucaryotes avec une substance chimique sélectionnée dans le groupe constitué par des séquences d'acides nucléiques, des protéines, des peptides et des substances chimiques pharmacologiquement actives, caractérisé en ce qu'il comprend la mise en contact et l'incubation d'un vecteur de transfection selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, dans un tampon de dilution comprenant du NaCl 100-150 mM avec des cellules eucaryotes pendant 15 à 120 minutes à température ambiante, le rapport substance chimique à transfacter sur peptide de transfection étant compris entre 0,3:1 et 15:1, de manière préférée entre 2:1 et 6:1, de préférence entre 4:1 et 6:1.

10°) Vecteur peptidique de transfection d'une substance chimique sélectionnée dans le groupe constitué par des séquences d'acides nucléiques, des protéines, des peptides et des substances chimiques pharmacologiquement actives, caractérisé en ce qu'il contient outre ladite substance chimique, au moins un peptide de transfection qui comprend :

- un segment d'une séquence NLS constitué par la séquence ID NO:2,
- un segment d'une séquence constitué par la séquence ID NO:10,
- un segment d'une séquence constitué par la séquence ID NO:16,

20 et

- une polylysine,

pour une utilisation comme médicament.

THIS PAGE BLANK (USPTO)